



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA**

Curso Académico:

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento al director de este TFM, el Dr. Ramón Martínez Máñez, perteneciente al departamento de Química de la Universitat Politècnica de València y al CIBER-BBN, por haberme dado la oportunidad de hacer posible este Trabajo Final de Máster y por toda su ayuda brindada en la consecución de éste.

Quiero hacer una especial mención a mi co-Directora, la Dra Patricia Rico Tortosa, del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, por haberme brindado la confianza de llevar a cabo un proyecto como éste, por haber tenido tanta paciencia y constancia conmigo, por su apoyo y su tutela y por haberme devuelto la pasión por la Ingeniería Tisular. Lo que ha tenido que pasar conmigo no ha sido fácil y sólo le pido a los cielos algún día poder llegar a ser siquiera la mitad de buen investigador que ella.

Quiero aprovechar para agradecerle a Joaquín, a quien le debo absolutamente todos los conocimientos que he ido adquiriendo de una técnica tan artesanal y bonita como es el *electrospinning* y sobretodo, por haberme inflado la pasión que sentía por la ingeniería. Nunca tendré palabras suficientes para agradecerle tan magnífico regalo y sólo puedo decirle que ha sido un auténtico honor haberle conocido y trabajado con él. No sólo me llevo a un colega profesional, me llevo a un gran amigo.

Quiero agradecerles a mis compañeros del CBIT todos esos momentos compartidos durante esos meses. En especial a Guillermo, a Álvaro y a Sergio. No sólo han sido los mejores compañeros de despacho que uno podía tener, han sido unas personas increíbles de las que quiero aprender cada día más.

Quiero agradecerle a Fran ese incondicional apoyo, si hay alguien que pueda decir que ha sido un fiel compañero durante todos estos meses es él. Gracias por soportarme en mis rabietas y en mis momentos más cansinos, gracias por haber reído conmigo, por haberme animado y por haberme consolado. Pensaba que tenía un gran amigo ahí y me has demostrado que lo que tenía era un hermano. Por todo ello sólo puedo decirte que gracias.

Otra persona que se merece una mención especial es Marina. Gracias por el incondicional apoyo que me ha dado todos estos meses, por todas esas risas, esos lloros y esos momentos inolvidables que hemos vivido. El destino me ha brindado un regalo enorme al hacernos trabajar en el mismo equipo. No sólo he conocido a una profesional increíble, además he conocido a una de las mejores personas del mundo por las que siento un profundo respeto y una enorme adoración. El mundo sería un sitio increíble con más personas como ella.

Finalmente les quiero agradecer a mi madre y a mi hermana el haber estado siempre ahí. Una vez más me han demostrado ser mi columna vertebral, no sólo en el trabajo sino en todos los aspectos de mi vida. No puedo sino agradecerles haber creído tanto en mí, incluso cuando ni yo mismo lo hacía. Mi deseo de seguir creciendo como profesional y como persona se lo debo en especial a ellas dos. Espero que algún día puedan estar tan orgullosas ellas de mí como yo lo estoy de ellas. No terminar sin deciros que sois, habéis sido y siempre seréis mis heroínas. Os quiero.

RESUMEN

El PLLA (*Ácido poliláctico*) es un polímero biodegradable ampliamente utilizado en la Ingeniería Tisular que presenta buenas propiedades materiales con una tasa de degradación lenta. El desarrollo de membranas electrohiladas tridimensionales aporta un nicho celular adecuado para el desarrollo de células musculares debido a que mimetiza en gran medida la fisiología de la matriz extracelular característica del tejido muscular. Además las fibras proporcionan una mayor área superficial de las muestras que confieren un mayor número de puntos de anclaje celular y permiten que los substratos se degraden más rápidamente. El boro es un metaloide esencial que participa en numerosas rutas metabólicas, tanto en vegetales como en animales y su implicación en procesos de diferenciación miogénica se han puesto de manifiesto recientemente.

En este trabajo se plantea el diseño de una membrana electrohilada capaz de actuar como medio de liberación controlada de iones Boro con aplicaciones en Ingeniería Tisular para la regeneración/repación de músculo. Para ello se empleará una técnica novedosa como es el *electrospinning coaxial*, que ha adquirido especial interés en el sector biomédico porque permite que sea el propio entramado polimérico el que sea cargado con soluciones acuosas de cualquier tipo permitiendo así una gran versatilidad en su posterior aplicación biomédica.

Para la obtención de dicho diseño se ha elaborado un protocolo con el que conseguir nanofibras rellenas de una disolución acuosa de Borax. Los materiales producidos han sido caracterizados morfológicamente con microscopía *FESEM* y *TEM*. Se ha caracterizado su tensión superficial y por espectroscopia infrarroja se ha analizado la presencia de los iones borato. Así mismo, ha sido estudiada la capacidad de liberación de los iones, la velocidad de degradación de las membranas electrohiladas y se han comparado con otros sistemas convencionales. Finalmente, se ha estudiado el comportamiento térmico de las membranas mediante técnicas de calorimetría diferencial de Barrido (*DSC*) y termogravimetría (*TGA*).

Palabras clave: Electrohilado coaxial, tejido muscular, ácido poliláctico, PLLA, membrana electrohilada.

RESUM

El PLLA (àcid polilàctic) és un polímer biodegradable àmpliament utilitzat en l'Enginyeria Tissular que presenta bones propietats però té una taxa una degradació lenta. El desenvolupament de membranes electrofilades tridimensionals aporta un nínxol cel·lular adequat al desenvolupament de cèl·lules musculars a causa que mimetitza el gran manera la fisiologia de la matriu extracel·lular característica del teixit muscular. A més a més les fibres proporcionen una major àrea superficial de les mostres que confereixen un major nombre de punts d'ancoratge cel·lular i permeten que els substracts es degraden mes ràpidament. El bor és un metal·loide essencial que participa en nombroses rutes metabòliques, tant en vegetals com en animals i la seva implicació en processos de diferenciació miogènica s'han posat de manifest recentment.

En aquest treball es planteja el disseny d'una membrana electrofilada capaç d'actuar com a mitjà d'alliberament controlat d'ions Bor amb aplicacions en Enginyeria Tissular per a la regeneració/recuperació de múscul. Per a açò, s'emprarà una tècnica nova com és el electrospinning coaxial, que ha adquirit especial interès en el sector biomèdic perquè permet que siga el propi entramat polimèric el que siga carregat amb solucions aquoses de qualsevol tipus permetent així una gran versatilitat en la seva posterior aplicació biomèdica.

Per a l'obtenció d'aquest disseny s'ha elaborat un protocol amb el qual aconseguir nanofibres farcides d'una dissolució aquosa de Borax. Els materials produïts han estat caracteritzats morfològicament amb microscòpia FESEM i TEM. S'ha caracteritzat la seva tensió superficial i per espectroscòpia infraroja s'ha analitzat la presència del ions borat. Així mateix, ha estat estudiada la capacitat d'alliberament dels ions, la velocitat de degradació de les membranes electrofilades i s'han comparat amb altres sistemes convencionals. Finalment, s'ha estudiat el comportament tèrmic de les membranes mitjançant tècniques de calorimetria diferencial d'escombratge (DSC) i termogravimetria (TGA).

Paraules clau: Electrofilat coaxial, teixit muscular, membranes de àcid polilàctic, nanofibres PLLA, membrana electrofilada.

ABSTRACT

PLLA (polylactic acid) is a biodegradable polymer widely used in Tissue Engineering with good material properties and slow degradation rate. The development of tridimensional electrospun membranes provides a suitable cellular niche for the muscular cells development because it can imitate the characteristic extracellular matrix. In addition fibers provides higher surface area to samples, give more cellular attachment points and allow a faster substrate degradation rate. On the other hand Boron is an essential metalloid which takes part in a large number of metabolic pathways, both in vegetables and animals. Furthermore, its participation in myogenic differentiation processes has been shown recently.

This work suggest an electrospun membrane design capable to act as controlled-release way of Borax ions for provide muscular regeneration in Tissue Engineering applications. For this purpose it will used coaxial electrospinning, a novel technique which recently has acquired interest in biomedical sector. This technique allows that the polymeric structure was charged with any type of aqueous solutions, offering high versatility in its posterior biomedical application.

To obtain this design it has been developed a methodology which produces nanofibers filled with a Borax aqueous solution. The materials were characterized morphologically with FESEM and TEM microscopy. It has been characterized their surface tension and analyzed the boron presence by infrared spectroscopy. In the same way it has been studied their ion release capability and their degradation rate, doing a comparison with another conventional systems. Finally it has been studied the membranes thermal performance employing differential scanning calorimetry and termogravimetric analysis.

Keywords: Coaxial electrospinning, muscle tissue, polylactic acid membranes, PLLA nanofibers, electrospun membranes.

ÍNDICE

MEMORIA DESCRIPTIVA	1
1. OBJETIVOS	3
2. INTRODUCCION	5
2.1. ANTECEDENTES	5
2.1.1. <i>Ingeniería Tisular: Componentes y línea de acción</i>	5
2.1.2. <i>Propuesta del material:</i>	8
2.1.3. <i>PLLA (Ácido Poliláctico). Características físico-químicas y biológicas</i>	8
2.1.4. <i>Aplicaciones previas del PLLA en la Ingeniería Tisular</i>	10
2.1.5. <i>Electrospinning</i>	12
2.1.5.1. <i>Electrospinning coaxial</i>	18
2.1.6. <i>El Boro. Características físico-químicas y biológicas</i>	21
2.1.7. <i>Utilización previa del Boro en Ingeniería Tisular</i>	22
2.1.8. <i>La problemática del Boro</i>	22
2.2. Motivación	23
2.3. Justificación	25
3. Normativa	27
4. Ámbito de aplicación y rango de soluciones del trabajo	29
4.1. <i>Diseño del experimento</i>	29
4.2. <i>Síntesis de membranas por solvent casting, spin coated y membranas electrohiladas</i>	30
4.3. <i>Caracterización microscópica</i>	36
4.4. <i>Caracterización físico-química</i>	37
4.5. <i>Caracterización térmica</i>	39
4.6. <i>Estudio de la liberación de las especies bioactivas</i>	41
4.7. <i>Estudio de la degradación de los soportes materiales</i>	41
5. Presentación y discusión de resultados	43
5.1. <i>Caracterización microscópica</i>	43
5.2. <i>Caracterización físico-química</i>	50
5.3. <i>Caracterización térmica</i>	54
5.4. <i>Estudio de la liberación del Boro</i>	61
5.4. <i>Estudio de la degradación de los soportes materiales</i>	64
6. Conclusiones	73
7. Anexos	75

8. Bibliografía	83
PLIEGO DE CONDICIONES	87
Condiciones generales.....	89
Condiciones generales facultativas	89
Condiciones generales legales	91
Condiciones generales económicas	92
Condiciones particulares	93
<i>Reactivos químicos empleados</i>	93
<i>Especificaciones de los equipos</i>	98
Condiciones de ejecución	104
<i>Limpiezas del material y mantenimiento en el laboratorio</i>	104
<i>Condiciones durante la fabricación de la membrana</i>	105
<i>Condiciones durante la fabricación de los films de PLLA por la técnica del Solvent Casting y el Spin Coating:</i>	106
<i>Condiciones para la correcta medida de la liberación</i>	106
<i>Condiciones para los ensayos de caracterización térmica</i>	106
<i>Condiciones para el ensayo de ángulo de contacto</i>	107
<i>Condiciones para la gestión de residuos</i>	107
PRESUPUESTO.....	109
Cuadro de mano de obra	112
Cuadro de materiales	113
Cuadro de maquinaria	114
Cuadro de precios descompuestos	116
Presupuesto y medición	120



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

MEMORIA DESCRIPTIVA

1. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Trabajo Final de Máster es diseñar una membrana electrohilada a partir de un poliéster alifático (PLLA), con iones Borato en su interior, para favorecer la diferenciación celular de mioblastos. Además de la fabricación de la membrana se pretende realizar una caracterización del material mediante la consecución de los siguientes objetivos:

- 1- Caracterización mediante estudios de espectroscopía para determinar de una forma no destructiva de las muestras si se ha conseguido introducir el medio bioactivo en su interior.
- 2- Caracterización microscópica de las membranas electrohiladas
- 3- Determinación de la tensión superficial de las membranas
- 4- Estudio de liberación controlada y de velocidad de degradación en un entorno que simule el medio fisiológico, comparándolo con otras formas materiales del PLLA.
- 5- Estudio del comportamiento térmico del sistema y determinación de las propiedades del polímero.

La consecución de estos objetivos principales requerirá el cumplimiento de la siguiente serie de objetivos secundarios:

- Búsqueda de información bibliográfica sobre las materias y las técnicas empleadas para conocer el estado del arte respecto a la problemática planteada.
- Elaborar un protocolo de fabricación de membranas electrohiladas activas con la técnica del *electrospinning* coaxial para diferentes configuraciones espaciales de las nanofibras depositadas.
- Identificar cuáles son aquellos factores que permiten conseguir unas propiedades más cercanas a las deseadas para la aplicación final.
- Realizar una valoración crítica de los resultados obtenidos que permitan sintetizar unas conclusiones que corroboren si se han alcanzado los objetivos del proyecto.
- Elaborar una memoria de carácter formal en donde queden reflejados aquellos conocimientos que se han adquirido, los resultados obtenidos, las evaluaciones de éstos y las conclusiones que de dichos resultados se puedan extraer.
- Redactar un presupuesto que justifique de manera veraz los costes incurridos por las actividades realizadas en el trabajo. A su vez se pide un documento donde queden registradas, sin omisión alguna, todas aquellas condiciones por las que se regirá el Trabajo de Final de Máster y que se han acordado entre la escuela técnica superior de Ingenieros Industriales de la Universitat Politècnica de València.

2. INTRODUCCION

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Ingeniería Tisular: Componentes y línea de acción

La lesión de tejidos debido a causas traumáticas o consecuencia de algunos tipos de enfermedades son una de las mayores causas de padecimiento y muerte a escala mundial. Los tratamientos que convencionalmente se han usado para solucionar estos problemas han sido el trasplante de tejidos y órganos o, el uso de prótesis. [1]

Estas medidas, aunque logran incrementar el tiempo y la calidad de vida, presentan ciertas limitaciones importantes difíciles de solventar:

- Los *trasplantes autólogos* (procedentes del tejido del mismo paciente) adolecen de problemas de escasez.
- Hay falta de donantes de tejidos y órganos y, generalmente si el tejido es *alógeno*, se pueden producir reacciones de rechazo. Paliar este problema implica administrar al paciente fármacos inmunosupresores que le pueden dejar expuesto a otro tipo de patologías.
- Los procedimientos invasivos pueden provocar daños en el paciente que se pueden complicar impidiendo que el tejido trasplantado realice su función correctamente.
- Un implante no *biocompatible* en el organismo receptor causa una reacción al cuerpo extraño que suelen ir asociados con infecciones secundarias
- Los implantes se diseñan para que cumplan una función biológica específica y tienden a relegar a un segundo plano al resto de funciones biológicas que cumple el tejido que pretenden sustituir.

Ante estas limitaciones, la Ingeniería Tisular representa una alternativa prometedora para superar estos límites detectados en la medicina actual.

Formalmente está definida como la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida a través del conocimiento de las relaciones estructura-función en tejidos sanos y patológicos de mamíferos y en el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan e incluso mejoren la función del tejido original. [2]

Presenta la ventaja, sobre otro tipo de terapias, de que el tejido “diseñado” se integra dentro del paciente permitiendo una cura específica y, potencialmente, permanente del tejido dañado. La Ingeniería Tisular actualmente está buscando la mejor forma de diseñar materiales que simulen piel, tejido cardiovascular, hepático, cartilaginoso, óseo, muscular, neuronal y otros tipos de tejidos.

La Ingeniería Tisular trabaja principalmente con dos componentes que son las células y los soportes materiales:

- Las células son los organismos encargados de sintetizar la matriz extracelular que da lugar al tejido nuevo. Se clasifican generalmente según su procedencia y su capacidad de división.
- Dentro del primer grupo (por su procedencia) se encuentran las que proceden del mismo individuo (autólogas) y por tanto no llevan asociados problemas de rechazo y las que tienen un origen externo al individuo.
- Respecto a las que tienen un origen externo al individuo las células pueden proceder, o bien de otro individuo pero de la misma especie (alogénicas) o, de un espécimen de otra especie (xenogénicas). A causa de su origen externo al organismo, ambos tipos, suelen llevar asociados problemas de rechazo.
- Dentro del segundo grupo de clasificación (por su capacidad de división) se distinguen entre células madre (células no diferenciadas que en función de las condiciones del medio de cultivo pueden dar lugar a varios tipos de células) de y células diferenciadas (con una función de tejido específica, su capacidad para dividirse disminuye considerablemente).

Por el otro lado, los soportes materiales se encargan de darle una estructura de anclaje a las células donde poder crecer, replicarse y diferenciarse dando tejido nuevo.

Atendiendo a su composición química pueden encontrarse materiales metálicos (empleado en aplicaciones médicas de fijación como tornillos dentales por ejemplo), materiales cerámicos (bastante empleados para regeneración ósea) y poliméricos.

La Ingeniería Tisular se está centrando en los materiales poliméricos dada la facilidad para moldearlos, la variabilidad de propiedades físico-químicas que se pueden obtener, el control sobre su degradación y la capacidad para modificarlos para fomentar la adhesión celular. Dentro de los polímeros se trabajan con polímeros sintéticos o naturales. En la ingeniería tisular, los materiales se suelen encontrar de ambas formas.

- *Scaffolds*: Biomateriales que actúan como soporte estructural temporal para el crecimiento guiado de células y tejidos a lo largo de todo un entramado tridimensional mientras aporta simultáneamente un soporte mecánico adecuado a la aplicación deseada.

Al tener que albergar células deben de cumplir una serie de requisitos como son: que tenga biocompatibilidad y biodegradabilidad, una velocidad de degradación adecuada que coincida con la de formación del tejido nuevo, propiedades superficiales que favorezcan el anclaje celular y su posterior proliferación, crecimiento y diferenciación, una estructura porosa que permita albergar las células y el libre intercambio con el medio de nutrientes y metabolitos de desecho. [3]

- *Carriers*: Biomateriales (también *biodegradables* y *biocompatibles*) fabricados en forma de microesferas o micropartículas con el objetivo de encapsular y aislar fármacos, factores de crecimiento o a las propias células y liberarlas en la zona afectada.

Resultan de especial interés porque se emplean para liberación controlada, bien por difusión a través de la estructura polimérica, por modificaciones que realiza en su estructura ante cambios en determinados factores ambientales (pH, altas/bajas concentraciones de una determinada especie, etc...) o, por simple degradación del recubrimiento polimérico que permita el escape del contenido al medio externo. [4]

Precisamente por esta aplicación se persigue que el material tenga buenas propiedades de difusión.

Una vez presentados las principales herramientas con las que trabaja la Ingeniería Tisular en la figura 1 se presenta visualmente su línea de acción.

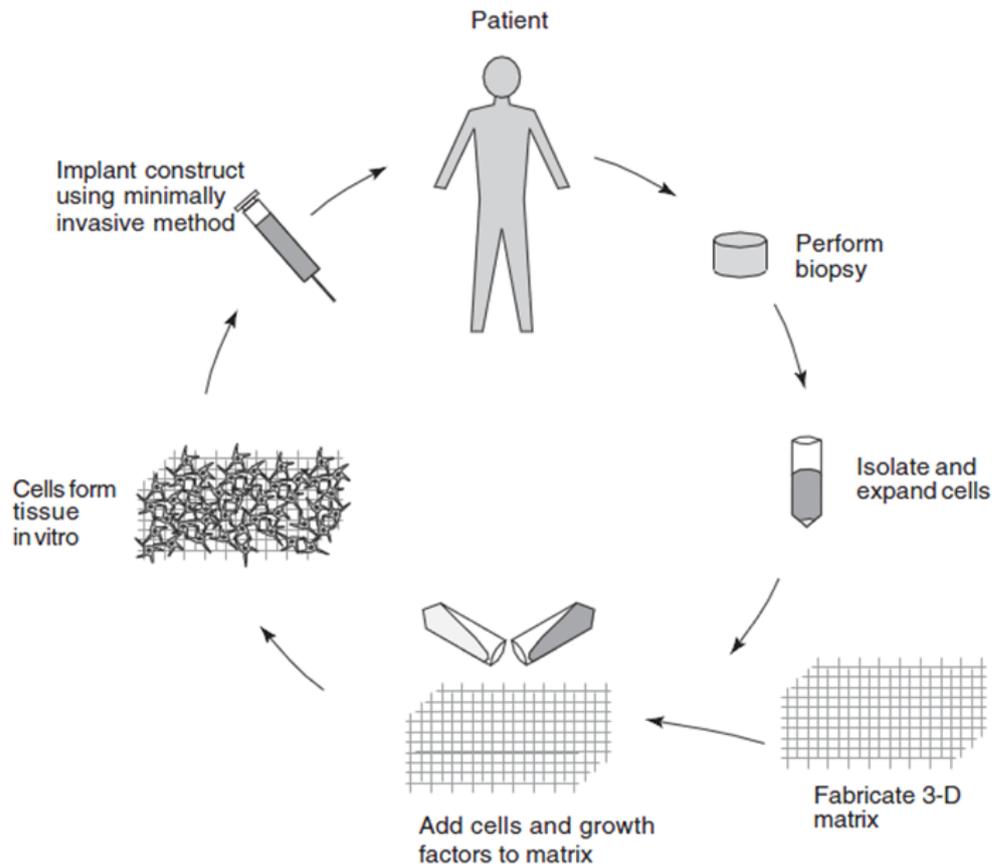


Figura 1. Esquema de acción de la Ingeniería Tisular. Representación extraída de [1]

Como se observa en la figura, la línea de acción es la siguiente:

1.- Se extraen células del propio paciente que se aíslan y se cultivan en un bioreactor. A su vez, se elabora el *scaffold* que se encarga de aportar el soporte físico que emule a la matriz extracelular.

2.- Una vez fabricado el material y con una cantidad suficiente de células, se reinsertan éstas en la matriz artificial y se restituye el sistema al paciente para que las células sigan creciendo, proliferando y diferenciándose en el organismo huésped, obteniendo el tejido nuevo.

El presente trabajo propone la elaboración de un *scaffold* empleando ácido poliláctico como material base en forma de nanofibras por lo que a continuación se describe más detalladamente este material.

2.1.2. Propuesta del material:

2.1.3. PLLA (Ácido Poliláctico). Características físico-químicas y biológicas

El ácido poliláctico, $([-O-CH(CH_3)-CO-]_n)$, es un α -hidroxi ácido perteneciente a la familia de los ésteres alifáticos; es biodegradable y compostable. [5]

Se produce de forma natural en los músculos de los mamíferos durante la glicogenólisis y participa en la etapa metabólica celular del ciclo de *Krebs* a través de ácido pirúvico y la Acetil-CoA. [6]

Comercialmente se produce por reacciones de condensación directa, por reacciones de polimerización por apertura de anillo mejorada con catalizadores basados en Sn (II) (empleados por la industria por su mayor grado de conversión) y por obtención natural a partir de fermentación bacteriana de azúcares [7], por lo que es una materia prima renovable.

Es una molécula quiral y, por tanto, en la naturaleza existe tanto en su forma L como en su forma D o, también se puede encontrar como mezclas racémicas de ambos enantiómeros.

Los monómeros de ácido láctico con actividad óptica dan lugar a polímeros semicristalinos mientras que si provienen de monómeros carentes de actividad óptica, los polímeros de PLA obtenidos son amorfos. El PLA tiene una temperatura de transición vítrea de 55°C, aproximadamente, y una temperatura de fusión (cuando es semicristalino) próxima a los 175°C [8]. A temperaturas por encima de 200°C, el polímero sufre degradación térmica por fenómenos de hidrólisis, escisión oxidativa de las cadenas y reacciones de transesterificación no deseadas inter e intramoleculares. [9]

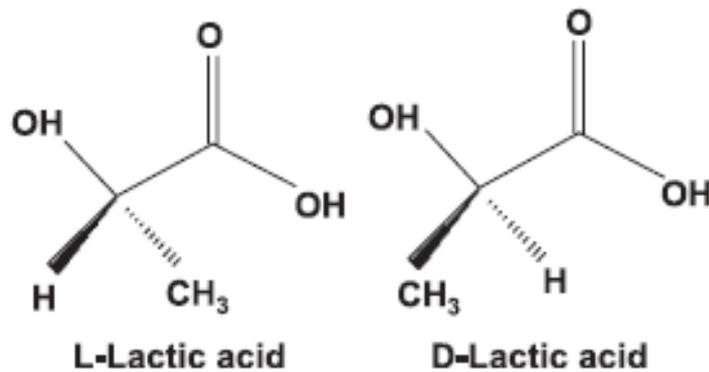


Figura 2. Representaciones enantioméricas del ácido poliláctico. [5]

En general, su forma L está más cotizada en aplicaciones que requieran alta resistencia mecánica y dureza, mientras que las formas D y L (amorfos) se destinan más en aplicaciones del tipo de liberación controlada, por lo que es importante que las especies activas tengan una dispersión adecuada en la matriz polimérica.

El PLA se degrada por hidrólisis de los enlaces éster y no se da por degradación enzimática en los organismos. [10]

La velocidad de degradación depende del tamaño y forma de la muestra, de la presencia de impurezas de bajo peso molecular, del tiempo, de la temperatura y, de la cantidad de unidades de lactato L y D presentes en las cadenas al influir en la cristalinidad del polímero (más cristalinidad implican tiempos de degradación mayores). [11]

EL mecanismo de degradación de los materiales basados en PLA consiste en un proceso conjunto de degradación tipo *bulk* y de erosión superficial. Cuando la velocidad de penetración del agua es mayor que la de degradación del polímero, el proceso de degradación pasa a estar controlado por una degradación uniforme tipo *bulk* de la matriz que se autocataliza al aumentar los grupos carboxílicos terminales (a causa de la biodegradación). [11]

Sin embargo, presenta una serie de desventajas entre las que se pueden encontrar:

- Es un material de dureza baja; su resistencia a la tracción y su módulo elástico son muy comparables a los del *PET*. Estas características limitan su utilización en aplicaciones que requieran elevada capacidad de deformación a niveles de esfuerzos elevados.
- Como resultado de su velocidad de degradación lenta, al ser semicristalinas ambas formas del polímero aunque con mezclas de diferentes proporciones de forma L (PLLA) y mezcla racémica L, D (PDLLA), se ha logrado modificar su comportamiento frente a la hidrólisis así como modificar sus propiedades mecánicas. [12]

- El PLLA es bastante hidrófobo, lo que implica una alta afinidad celular y puede dar lugar a una respuesta inflamatoria del organismo huésped al tener contacto directo con fluidos biológicos por la liberación de grupos ácidos. [13]
- Dada la escasez de grupos funcionales reactivos en la cadena, transformando a la molécula en químicamente inerte y dificultando posibles modificaciones químicas en la superficie o en el “*bulk*”.

2.1.4. Aplicaciones previas del PLLA en la Ingeniería Tisular

El PLLA se emplea con bastante frecuencia en aplicaciones médicas ya que no produce efectos locales tóxicos ni carcinogénicos, es biodegradable y sus productos de degradación tampoco son nocivos.

Entre las más comunes está la de emplearlo para suturas donde, el PLLA, se dispone en forma de filamentos que se encargan de sostener los tejidos adyacentes a una herida hasta que por el proceso de sanación natural el tejido formado tenga la fuerza mecánica para sostenerse sólo. [14]

Para controlar la velocidad de degradación se han fabricado hilos de sutura con copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico (PLLA/PGA).

Gracias a su mecanismo de degradación, el PLLA también se emplea para sistemas de liberación controlada de fármacos donde se pretende que el principio activo se libere gradualmente conforme la envoltura polimérica se degrade por erosión superficial; ejemplo de lo expuesto, es el trabajo de *Eerink et al* [15], que emplea sistemas de liberación basados en fibras de PLLA con una mezcla de polivinilpirridona (PVP) que rellena de *Levonorgestol* para liberar de forma gradual la hormona en el medio de interés.

EL PLLA, tanto en sus formas L y D, se emplea también como soporte para la fijación en fracturas y osteomías. Generalmente, estos implantes tienen unos tiempos de degradación que varían desde los 10 meses hasta los 4 años según su composición química, su cristalinidad y su porosidad, entre otros factores microestructurales. [16]

En el campo de la ingeniería tisular, el PLLA también ha permitido la elaboración de *scaffolds* para obtener diferentes tipos de tejido. En forma de *films* de *Solvent Casting*, [17] *Santos et al*, elaboró membranas con diferentes tamaño de poro para regeneración de la piel y para controlar su velocidad de degradación se ha repetido la estrategia de hacer dichas membranas de copolímeros de PLLA/Poli(hidroxibuterato-co-hidroxivalerato) para que degrade más rápidamente. [18]

También se han elaborado soportes tubulares de mezclas de PDLLA/PLLA, a diferentes proporciones, para producir tejido del endotelio (mayor cantidad de PLLA aquellos que soporten más presión como es el caso de las arterias). [19]

El PLLA se emplea, también, en regeneración de tejido óseo en forma de composites donde el polímero aporta la matriz y el cerámico se incluye en forma de partículas que aportan un refuerzo mecánico (el PLLA por sí sólo no puede atender las demandas de carga). [11]

En dichos composites, el PLLA y el PGA, además de poder ir degradándose paulatinamente a la vez que se está regenerando el tejido óseo, se ha visto que aumenta la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, incrementa la síntesis de colágeno tipo I y favorece el crecimiento y la proliferación de osteocitos. [20]

A continuación se presenta en la figura 3 unas imágenes de microscopía electrónica de las membranas porosas elaboradas con PLA para regeneración del tejido óseo.

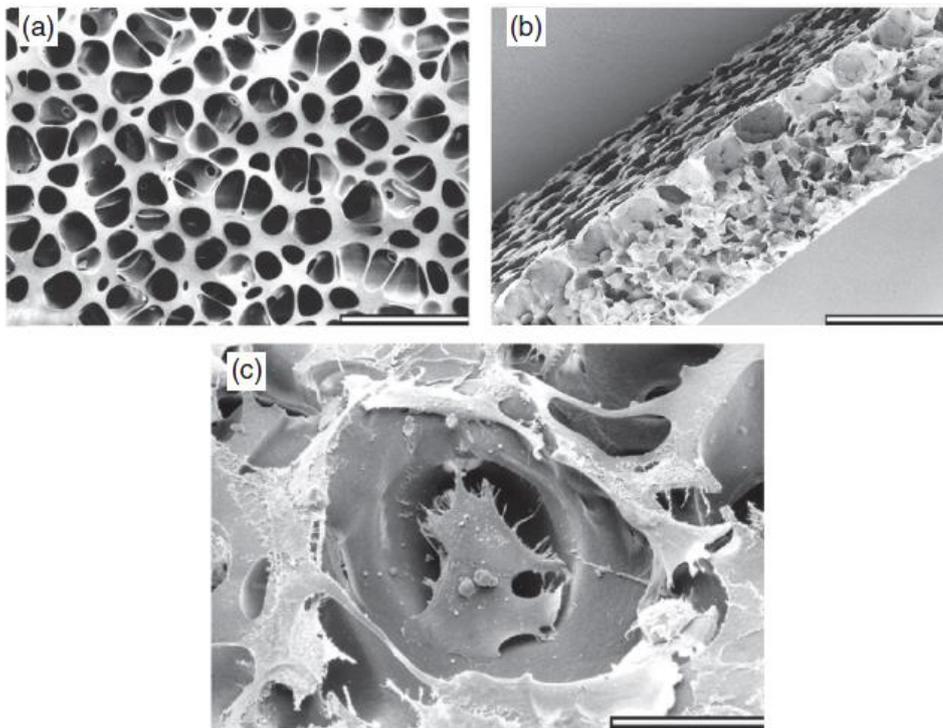


Figura 3. Imagen SEM de las membranas porosas de PLA. La imagen *a*) muestra las superficie de la membrana; la imagen *b*) la superficie transversal (barra de escala representa 200 μm) y la imagen *c*) muestra las células ancladas a la superficie de la membrana y creciendo en los poros (en esta imagen la barra de escala representa 50 μm) Imagen extraída de [21].

El PLLA está resultando un material especialmente interesante en la regeneración del tejido nervioso y se está empezando a trabajar con él con una nueva forma, las *nanofibras*. Con este nuevo sistema se pretende producir *scaffolds* que hagan de canales guías para reparación de tejidos cuyas células diferenciadas tengan morfología alargada (axones neuronales o fibras del músculo esquelético).

Yang et al [22] elaboró esta nueva variedad de *scaffolds* con la que además comprobó que las fibras aportaban una elevada superficie que actuaría como soporte para factores de crecimiento celular y comprobó su adhesión en *scaffolds* de nanofibras de PLLA paralelas en la dirección de sus ejes longitudinales tal y cómo se muestra la figura 4.

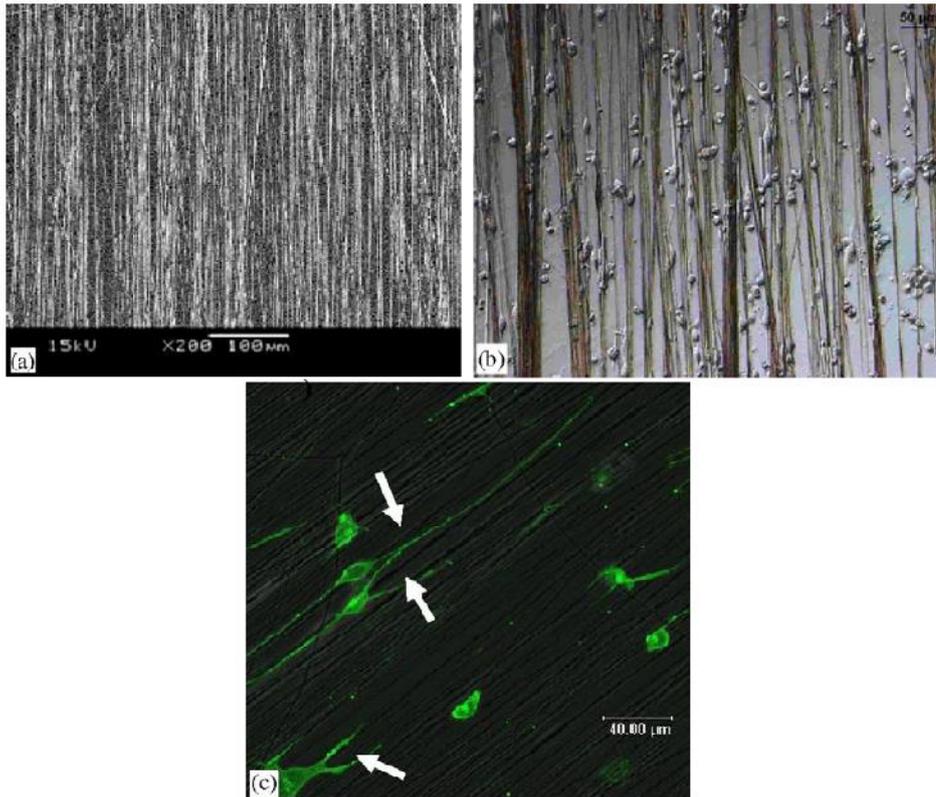


Figura 4. La imagen (a) es una fotografía SEM a 200 aumentos. La imagen (b) es una fotografía de las células madre neuronales cultivadas un tiempo de 1 día sobre un *scaffold* con nanofibras de PLLA. La imagen (c) es una fotografía bajo el microscopio de fluorescencia a 400 aumentos de las células madre neuronales sobre las nanofibras de PLLA en un tiempo de cultivo de 2 días. Imágenes extraídas de [22].

Este trabajo pretende realizar un *scaffold* de nanofibras de PLLA basándose en que, de forma análoga a lo ocurrido en con las células neuronales, se pueda obtener también un medio adecuado para que los mioblastos se diferencien en miotubos y puedan actuar como soporte del tejido muscular esquelético.

Es por eso que se ha considerado importante dedicarle una parte del documento a hablar de la técnica empleada para conseguir la obtención de nanofibras de PLLA. Esa técnica es el *electrospinning*.

2.1.5. *Electrospinning*

El *electrospinning* es una tecnología de hilado de fibras con la que se obtienen fibras tridimensionales ultrafinas (diámetros de nanómetros a pocas micras) de longitudes elevadas. Las fibras en la escala nanométrica han despertado interés por sus propiedades únicas entre las que se destacan [23]:

- Elevadísima área superficial por masa de fibra.
- Porosidad elevada de la membrana que se forma con opción de ajustar los tamaños de poro.
- Propiedades superficiales ajustables.
- Elevada permeabilidad.
- Peso de fibras bajo y capacidad para retener las cargas electrostáticas.

Nace a partir de la combinación de dos técnicas, el *electrospraying* y el *spinning*. Mediante la aplicación de un elevado campo eléctrico se carga eléctricamente un fluido (o bien material fundido o una solución) que, en forma de gotas, va saliendo de una boquilla (que actúa como un electrodo). A causa de las fuerzas eléctricas, la gota se va deformando en la salida hasta que se forma un cono, conocido como cono de *Taylor*, el cual va emitiendo un pequeño chorro de polímero (su reología puede evitar que se rompa el chorro en gotas) que, sometido a la aceleración por el campo eléctrico que le hace ir hacia el contraelectrodo, se deposita en éste último en forma de nanofibras continuas tal y como muestra la figura 5.

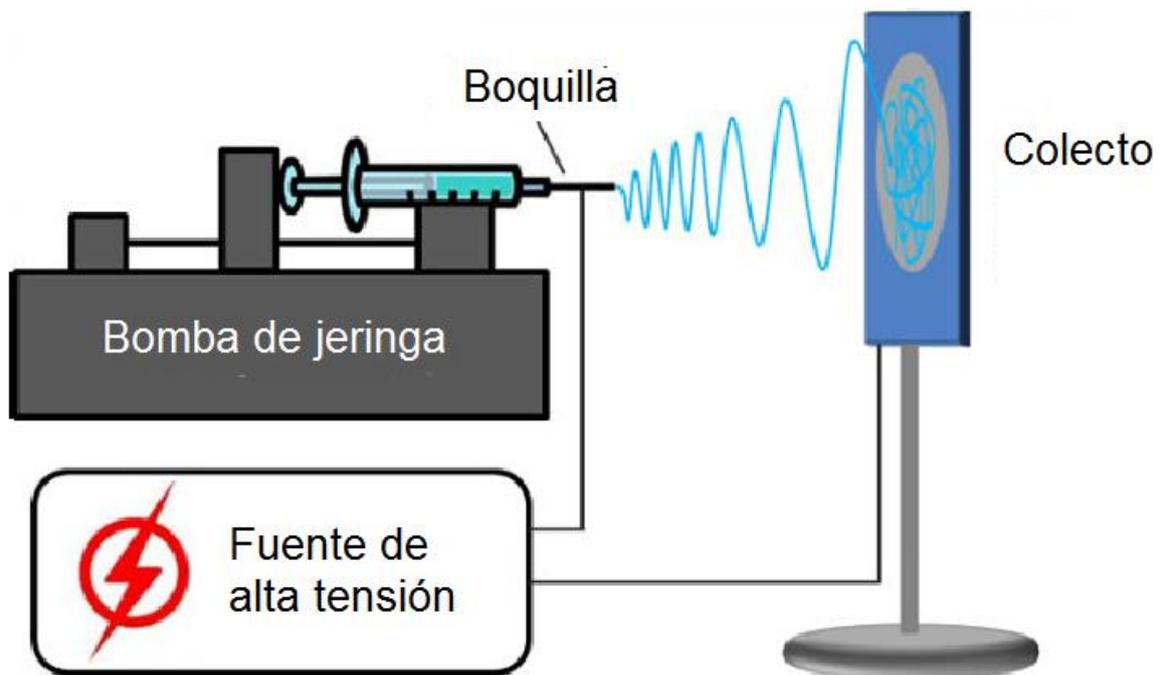


Figura 5. Esquema de montaje de equipo de *electrospinning*. Imagen extraída de [24].

Los parámetros principales de los que depende el proceso (que se forme el chorro y se forme la fibra continua) se muestran a continuación en la tabla 1:

Tabla 1. Parámetros influyentes en el proceso de *electrospinning*, información extraída de [25].

Parámetros influyentes en el proceso del electrospinning	
Propiedades de la solución	<ul style="list-style-type: none"> - Viscosidad - Concentración del polímero - Peso molecular del polímero - Conductividad eléctrica - Elasticidad - Tensión superficial
Parámetros de operación	<ul style="list-style-type: none"> - Voltaje aplicado - Distancia de la boquilla al colector - Caudal suministrado - Diámetro de la boquilla de salida
Condiciones ambientales	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura - Humedad ambiental - Presión atmosférica

Ir alternando uno u otro parámetro influye en el diámetro de nanofibra que se obtiene ofreciendo muchas posibilidades en función de que interese un tamaño u otro.

A continuación se realiza una breve descripción del efecto de los parámetros de proceso controlables más relevante.

Cabe destacar que no se puede tratar de estudiar un parámetro por sí solo respecto a los demás al estar todos interrelacionados (forman parte de la reología de la disolución):

- **Concentración:** A bajas concentraciones de polímero la viscosidad es muy baja por lo que es muy fácil que se interrumpa el chorro de polímero continuo y emitiendo en su lugar gotas. Además si el polímero está demasiado diluido es más que probable que no de tiempo suficiente a que el solvente se evapore, dando distribuciones y tamaños de fibra no uniforme e incluso pudiendo disolver el *scaffold* si se está trabajando en disposición vertical y una gota alcanza las nanofibras. Además hay que tener en cuenta que *la viscosidad y la tensión superficial son propiedades de la disolución dependientes de la concentración.*
- **Peso molecular y viscosidad del polímero:** Las propiedades reológicas (viscosidad, tensión superficial), así como la conductividad eléctrica y la resistencia dieléctrica del polímero, son propiedades muy dependientes del peso molecular (de forma análoga a la concentración). Un peso molecular elevado favorece la formación de fibras continuas por el incremento de viscosidad (es más difícil romper el chorro en gotas discontinuas). Sin embargo, se tiene que tener en cuenta, que un peso molecular elevado da lugar a interacciones de *Van der Waals* entre las cadenas de polímero y puede producir un efecto contraproducente en el diámetro de la fibra obtenida [26].

Una viscosidad muy baja favorece la interrupción del chorro continuo pero un exceso de ella provoca el secado prematuro del polímero en la boquilla de salida, pudiendo llegar a obstruirla. Por ello es importante elegir un tipo de polímero adecuado y un buen solvente.

A continuación se presenta un gráfico que relaciona el diámetro de fibra obtenido con los parámetros comentados en los párrafos anteriores llevados a cabo por S.-Han et al [25] para fibras de PLLA:

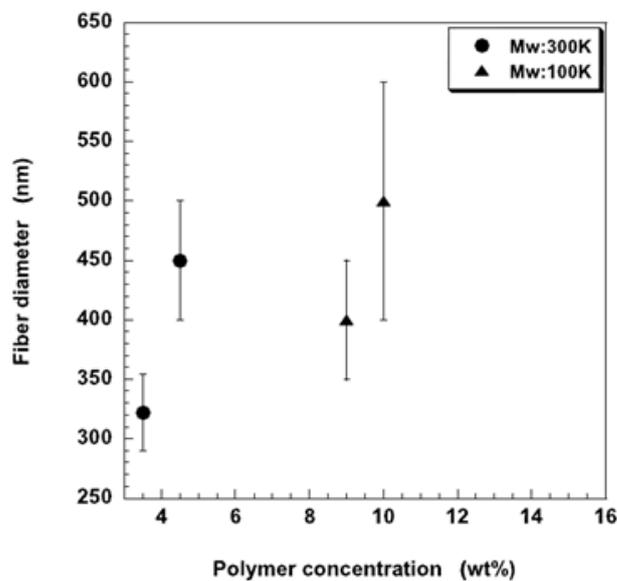


Figura 6. Relación entre la concentración de PLLA y el diámetro de nanofibra obtenido en un proceso de *electrospinning* con PLLA con pesos moleculares del polímero de 100 kDa y 300 kDa. Imagen obtenida de [25].

- Conductividad eléctrica: Una elevada conductividad del polímero favorece una formación homogénea de fibras debido a la distribución de carga eléctrica que, al verse sometida al campo eléctrico, produce que todas las fibras se vean atraídas con la misma aceleración. Para mejorar la conductividad se suelen añadir sales inorgánicas [26].
- Caudal suministrado, campo eléctrico aplicado y distancia de la boca de salida al colector: El caudal de polímero suministrado y el campo eléctrico necesario para lograr formar el cono de *Taylor* y producir el chorro de polímero están muy ligados. Una alimentación muy grande favorece más la formación de gotas en lugar del chorro. Se puede evitar este efecto incrementando el campo eléctrico.

Sin embargo, un campo eléctrico muy elevado sacrifica uniformidad de las fibras e incrementa su dispersión [27], además puede acelerar el polímero tanto que no dé tiempo a que se seque el solvente. Un caudal muy pequeño es incapaz de lograr emitir el chorro de polímero (se arrastra el polímero antes) de la punta de la boquilla.

Finalmente, la distancia entre colector y la boquilla tiene que ser la adecuada para que se evapore el solvente antes de que las fibras alcancen al colector. Dependerá de la concentración de polímero y del campo eléctrico que se esté aplicando. [28]

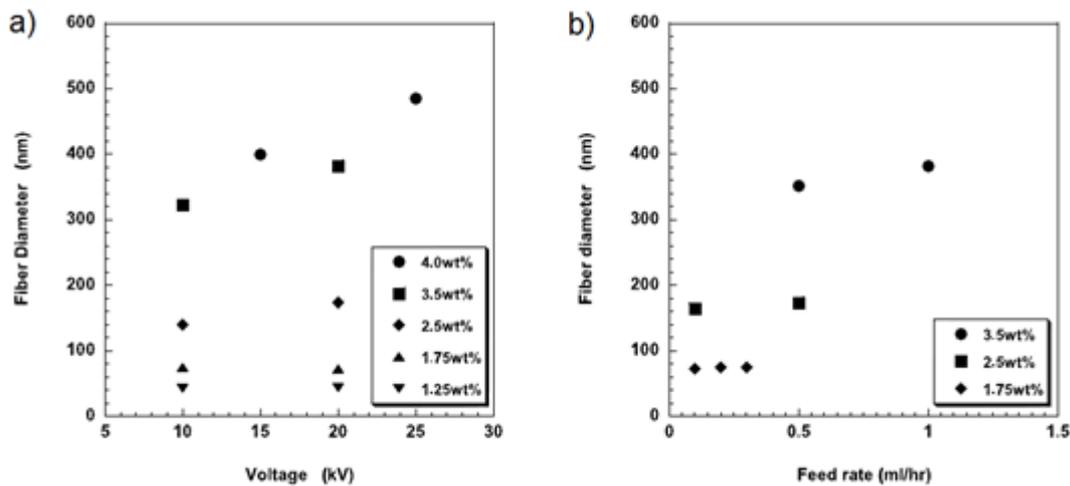


Figura 7. Relación entre el caudal de alimentación y el diámetro de nanofibra obtenido en un proceso de electrospinning con PLLA (a) y el campo eléctrico aplicado y el tamaño de fibra obtenido (b) para diferentes concentraciones de PLLA. Imagen obtenida de [25]

La figura 7 muestra cómo a concentraciones bajas, la cantidad de caudal o voltaje no influye al ser la masa de polímero insuficiente para dar fibras mayores. Sin embargo a concentraciones más elevadas, hay un incremento del diámetro de fibra al aumentar el voltaje y el caudal.

Las ventajas que lo vuelven un método competitivo frente a otras técnicas de producción de fibras son esa formación tan rápida de las nanofibras (logrando producciones muy grandes si se emplean varias boquillas), la opción de poder modificarlas superficialmente en función de su aplicación, que estas nanofibras tienen unas mejores propiedades mecánicas y que el proceso es relativamente fácil de manejar.

Estas ventajas, dentro del campo de la biomedicina, han despertado mucho interés y se pretende emplear esta técnica para producir materiales de recubrimiento, filtros, sensores, composites con nanofibras de refuerzo, aplicaciones ópticas, eléctricas o como *carriers* para liberación controlada de fármacos.

Como aplicación a destacar del electrospinning en la ingeniería tisular está la de producir entramados de fibras que actúen como *scaffolds* tridimensionales que imiten la matriz extracelular, permitiendo la adhesión de las células. A diferencia de otros tipos de arquitecturas de *scaffolds*, la principal característica que aporta el entramado de las nanofibras es que ofrecen a las células más puntos de anclaje para los receptores celulares al tener mayor área superficial tal y como muestra la figura 8 presentada a continuación.

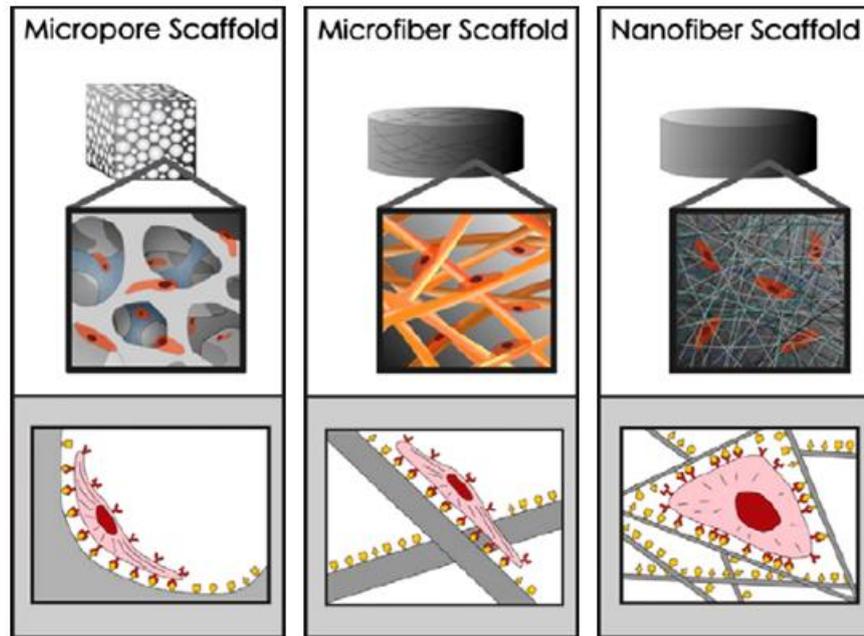


Figura 8. Diferentes arquitecturas de *scaffolds* y cómo influye su arquitectura sobre la adhesión celular. Imagen extraída de [29].

En el campo de la Ingeniería Tisular, atendiendo a las diferentes conformaciones arquitectónicas de *scaffolds* que se pueden obtener, se obtienen dos grandes grupos:

1. Formación de capas de nanofibras no entrelazadas de biomaterial para biomimetizar el entorno que puede ofrecer la matriz extracelular. Comúnmente conocido como *orientación aleatorias*; se obtienen cuando el colector está en estático. [30]
2. Modificaciones del proceso de *electrospinning* para lograr mimetizar el entorno extracelular logrando mejoras en la adhesión, proliferación y diferenciación de las células.

La orientación de la fibra puede influir en la diferenciación de las células, controlando la orientación de éstas y el crecimiento del tejido de interés. Por ejemplo, se ha comprobado en el caso del músculo esquelético, que presentan propiedades mecánicas anisótropas siendo muy superiores éstas en la dirección en la que está orientada la matriz extracelular o, que si ésta tiene las dimensiones y topología adecuadas, crecen células musculares lisas de arteria coronaria [29].

Las modificaciones más frecuentes que se les suele emplear son [31]:

- *Modificaciones en los elementos mecánicos del sistema:* tratan de obtener alineaciones de fibras u, otras configuraciones de éstas, mediante la implantación de tambores rotatorios, electrodos en paralelo, cuchillas inclinadas, etc... que permitan que las fibras obtenidas tengan configuraciones particulares en función de la aplicación y de la mejora que se quiera implementar.
- *Modificaciones sobre el campo eléctrico aplicado:* tratan de concentrar la proyección de nanofibras en zonas de interés a partir de controlar el chorro de polímero y el área de proyección empleando electrodos auxiliares y modificando las condiciones del campo eléctrico aplicado [32]. Se pueden emplear, combinado con elementos mecánicos, para obtener las nuevas configuraciones de las fibras en una zona de forma muy concentrada.
- *Modificaciones sobre el suministro de la disolución:* actúan directamente sobre la forma en que se suministra la solución polimérica a hilar. Abarcan diversas mejoras como la inclusión de múltiples agujas para conseguir un aumento de la producción de fibras, obtener una red de capas de polímeros distintos, cilindros huecos para aumentar la producción de fibras porosas o, emplear el *electrospinning coaxial* si se desea encapsular otra sustancia dentro de la fibra (especialmente interesante para liberación controlada) o, si se quieren obtener fibras huecas. [33]

2.1.5.1. Electrospinning coaxial

Como en el presente trabajo se emplea el *electrospinning coaxial*, a continuación se profundiza en esta variante del *electrospinning*. En esta modificación de la técnica dos fluidos inmiscibles se inyectan a través de dos capilares tubulares, uno dentro del otro, de forma que uno de los fluidos circula por el interior del conducto interno y el otro circula por la corona entre ambos conductos, tal y como se muestra en la figura 9.

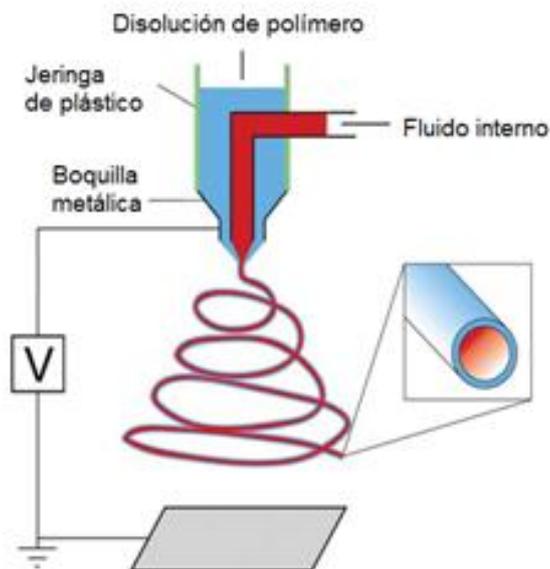


Figura 9. Montaje *electrospinning* coaxial con un solo fluido de relleno. Imagen extraída de [24]

Es importante tener en cuenta los caudales con los que se introducen los líquidos para que haya continuidad de la fibra y no se formen bolsas con fluido retenido. Para ello las velocidades lineales de ambos fluidos en el punto de salida han de ser iguales, de modo que si ambos fluidos tienen la misma velocidad de avance, cuando se aplica el campo eléctrico aparecen dos conos de *Taylor*, tal como se muestran en la figura 10.

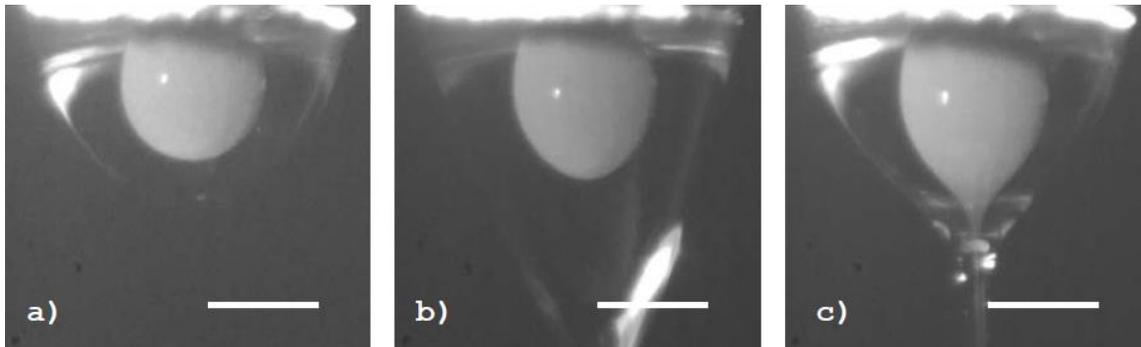


Figura 10. En la imagen *a)* se está empezando a incrementar el potencial eléctrico pero aún no ha formado chorro. En la imagen *b)* el campo eléctrico empieza a estirar la gota del fluido externo y en la *c)*, el campo eléctrico ha formado chorro con ambos fluidos, dando lugar a fibras rellenas. El fluido externo es polivinilpirrolidona y el interno es aceite mineral. Imagen extraída de [34].

El *electrospinning coaxial* abre un abanico de opciones interesantes. Posibilita la opción de hacer fibras de polímero que, por sí solo (en estado puro) no es hilable (aunque si se mezcla con aglutinantes pueda serlo).

Para esta aplicación se emplea un polímero hilable que va en el conducto externo mientras que en el conducto interno se suministra el flujo de polímero no hilable. Esta metodología hace que el chorro de polímero que recubre (*Shell*) arrastre al polímero situado en el centro (*Core*) quedando éste último con forma de fibra [34].

Permite, también, fabricar fibras huecas empleando un fluido de sacrificio; si la resistencia del polímero es suficiente, da lugar a una fibra cilíndrica cuyo contenido se elimina por difusión a través de pequeños poros o defectos que tenga la pared de la nanofibra.

El principio que sigue el *electrospinning coaxial* ha dado lugar a posibles variaciones muy interesantes como, puede ser, la de realizar fibras huecas con diferentes compartimentos (tal como se muestra en la figura 11) o con otro fluido dentro.

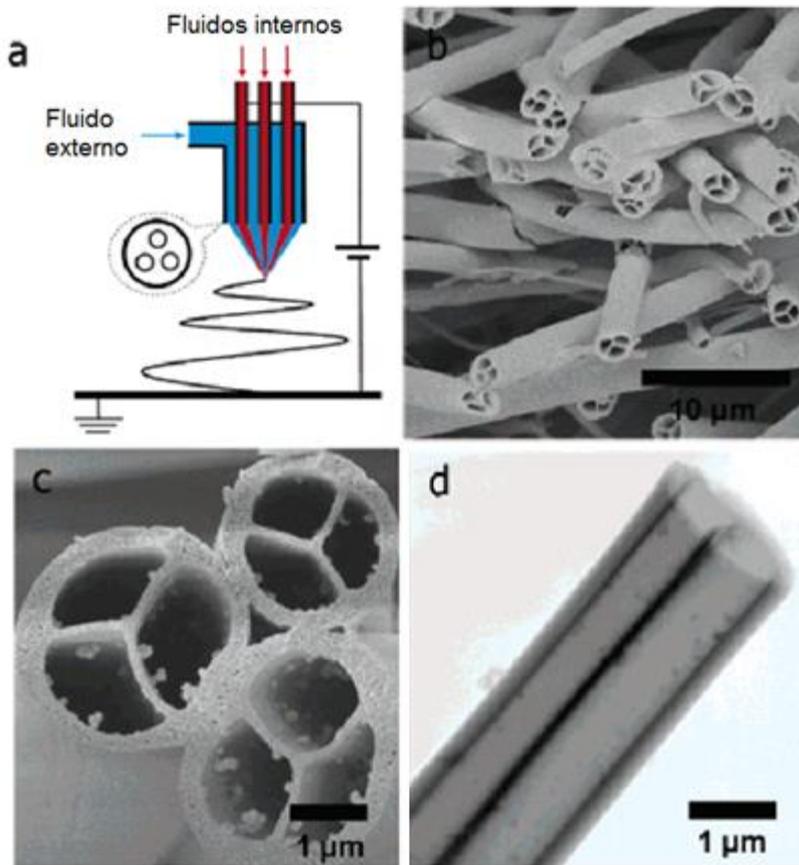


Figura 11. En la imagen *a*) se presenta un esquema del montaje del electrospinning coaxial donde en los conductos internos circula aceite de parafina y en el conducto externo circula una disolución de polivinilpirridona (PVP) con etanol y $Ti(OPr)_4$. Las figuras *(b)* y *(c)* son imágenes SEM de las nanofibras una vez producidas y eliminada la parafina del interior por tratamiento térmico posterior. La imagen *(d)* muestra una nanofibra individual donde se observa que los conductos siguen la dirección longitudinal de la fibra y son continuos. Imagen extraída de [35].

La posibilidad de encapsular fluidos empleando el *electrospinning coaxial* resulta especialmente atractiva en el campo de la biomedicina como, puede ser, para encerrar fármacos, factores de crecimiento, proteínas u otras sustancias de interés biológico. [34]

Generalmente la distribución de las especies encapsuladas es aleatoria a causa de la evolución de los chorros acelerados eléctricamente pudiendo formarse gotas encapsuladas (*beads*) a lo largo del polímero si la disolución interna no es polimérica.

Por ello resulta especialmente importante controlar que la velocidad de ambos fluidos sea la misma si se pretende conseguir una distribución del contenido continua o, en su defecto, lo más regular posible.

El presente trabajo propone el uso de una disolución acuosa de Boro como fluido interno de las nanofibras de PLLA, como nutriente del medio celular, que facilite la diferenciación de los mioblastos.

Como se emplea una segunda fase, (disolución acuosa de boro de diferentes concentraciones que se detallan más adelante) es necesario introducir a continuación la información relevante de este segundo medio encapsulado.

2.1.6. El Boro. Características físico-químicas y biológicas

El Boro es el elemento número 5 y se encuentra en el grupo XI. Se enlaza covalentemente a otros elementos para rellenar su capa de valencia. Ello hace que, aunque no sea un átomo que ceda protones con el medio, sea un muy buen ácido de *Lewis* (de forma análoga al Aluminio) y un buen aceptor de iones hidroxilo [36].

El Boro tiene una afinidad muy elevada hacia el oxígeno, dando boratos y otros oxo-compuestos. Posee una gran afinidad para formar complejos con moléculas orgánicas que tengan grupos hidroxilos adyacentes. Estos complejos han supuesto un gran aporte en procesos de síntesis orgánica, destacando la reacción de hidroboración de *Brown* [37] o, la reacción de acoplamiento C-C de *Suzuki* catalizada con paladio para unir moléculas orgánicas.

En la naturaleza, el boro se encuentra sobretodo en forma de boratos y, en altas concentraciones, en rocas sedimentarias, en el carbón vegetal, en el mar y en lodos. El boro también se encuentra presente en el organismo humano en unas proporciones medias que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 2. Contenido en boro en los tejidos humanos, medidos en mg de boro por kg de órgano (ppm). Información aportada de [38-39].

Órgano o tejido	Concentración media de Boro (ppm)
Corazón	28,00
Hueso de costilla	10,20
Hígado	2,31
Bazo	2,57
Pulmón	0,60
Riñón	0,60
Músculo esquelético	0,10
Cerebro	0,06

Biológicamente hablando, el Boro desempeña un importante papel en la nutrición de organismos vegetales [37] y, en combinación con otros cationes alcalinotérreos como el Mg^{2+} o el Ca^{2+} , interviene en rutas metabólicas de células de mamíferos influyendo en la producción de algunas moléculas esteroideas hormonales como, puede ser, el caso del estrógeno en mujeres postmenopáusicas o, en la formación de corticosteroides que alivian los síntomas de la artritis reumatoide (los huesos artríticos muestran concentraciones de 3 ppm frente a 70 ppm de los huesos sanos) [40].

El Boro, igualmente, interviene en el metabolismo de varios micronutrientes influyentes en el proceso de mineralización de los huesos como el calcio, el fósforo, el magnesio y la vitamina D, ayudando a prevenir la osteoporosis.

2.1.7. Utilización previa del Boro en Ingeniería Tisular

En la ingeniería tisular el Boro se ha empleado en los últimos años sobre todo para hacer vidrios bioactivos de mezclas de borato y borosilicato donde se ha observado que a concentraciones bajas aumenta la proliferación de células precursoras de osteocitos [41], dando lugar a un incremento en la cantidad de tejido óseo mayor y, a la formación de angiogénesis mayor en los vidrios bioactivos de borato y borosilicato que en aquellos vidrios bioactivos de silicatos.

Se ha visto también que el el ácido bórico en medio acuoso (producto del desprendimiento de micropartículas de vidrios bioactivos) tiene capacidad para activar moléculas de señalización para la enzima proteica quinasa que interviene en la respuesta celular y de otros factores de crecimiento celulares que favorecen la angiogénesis y la proliferación de células endoteliales [42]. Se ha empleado, también, en polímeros biodegradables como es el PLLA, donde se ha visto que favorece la miogénesis, el proceso de diferenciación de células de músculo de mioblasto a miotubo como se ha visto en el trabajo de Rico et al [37].

2.1.8. La problemática del Boro

La principal problemática que presenta el Boro es que en altas dosis presenta toxicidad La tolerancia depende del individuo, pero una ingestión elevada puede producir la muerte de una persona días después de la administración del Boro por fallos renales, colapsos en el sistema circulatorio o shock. Bioquímicamente, el boro, se puede detectar por carencia de riboflavina (figura 12) ya que si un individuo presenta boro en cantidad muy elevada, inhibe a las enzimas deshidrogenasas.

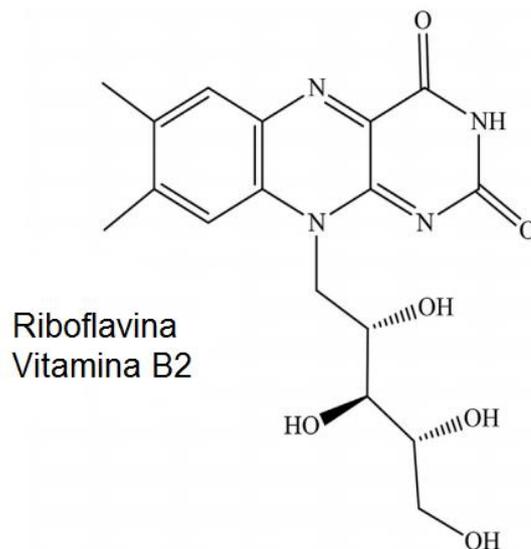


Figura 12. Estructura química de la riboflavina (vitamina B2) que en presencia de elevadas cantidades de Boro experimentaría un déficit importante a causa de las inhibiciones de las enzimas deshidrogenasas. Imagen extraída de [43].

En esa situación el paciente, también, suele mostrar en su sintomatología náuseas, vómitos y/o diarreas (el vómito y las heces tienen además un característico color verde-azulado), problemas renales, hipotermia, enrojecimiento, insomnio y fatiga. Si hubiera una intoxicación crónica de boro, los síntomas serían falta constante de apetito, náuseas abundantes y pérdida de masa corporal. [44]

2.2. Motivación

El presente trabajo es un Trabajo Final de Máster, del Máster de Ingeniería Química; el alumno debe aplicar aquellos conocimientos que ha ido adquiriendo en las diferentes asignaturas de dicho Máster con el fin de que el estudiante los utilice de una forma práctica en la ejecución de un trabajo original e individual.

El alumno, a lo largo de su estancia en el Máster, ha cursado una serie de asignaturas que le brindan la aptitud y capacidad de realizar un trabajo de estas características y envergadura:

- Química Orgánica avanzada: Dada la naturaleza orgánica de los tejidos biológicos y de los biopolímeros con los que se pretende sustituirlos, es necesario entender la química por la que se rigen estos sistemas. Así mismo, el alumno ha adquirido conocimientos sobre química de los compuestos de Boro, especie con la que se trabaja en este trabajo. Igualmente el alumno ha sido instruido en técnicas de elucidación estructural como son el *RMN* o el *FTIR*, técnicas de las que se hablará más adelante y que permiten la identificación química de las sustancias.
- Biomateriales: Dada la naturaleza del presente trabajo y su desarrollo con biopolímeros, en esta asignatura el alumno ha sido formado en las principales técnicas de síntesis y caracterización físico-química de los sistemas poliméricos.
- Control de la calidad en la Ingeniería Química: El alumno ha aprendido herramientas estadísticas que le permitan detectar si un proceso funciona dentro de su variabilidad natural o si hay causas anómalas que estén impidiendo su control y, en caso de haberlas, cómo eliminarlas o incorporarlas al proceso (si son positivas). También, se ha formado al alumno en las nociones necesarias de reproducibilidad y repetibilidad para poder llevar a cabo un correcto manejo del equipo.
- Diseño de experimentos para la optimización de procesos: Además, se ha instruido al alumno en los principales diseños de experimentos de forma que pueda detectar de forma eficiente aquellos factores significativos que rigen un proceso con el fin de poder predecir su respuesta y optimizarla para aprovechar siempre de la forma deseada las características de interés analizadas.
- Ciencia y tecnología de polímeros: Se han tratado las diferentes formas de sintetizar polímeros, los principales reactores empleados en la industria y los principales sistemas de post-tratamiento para obtener las propiedades finales deseadas.

- Materiales metálicos y cerámicos: Dada la naturaleza de las especies con las que se trabaja en el sector químico, el alumno debe de ser conocedor de que materiales son los adecuados para trabajar con ellas. Este planteamiento es extrapolable a escala de laboratorio y el alumno debe de ser conocedor en todo momento de que recipientes y que elementos emplear dada la diferente naturaleza de las sustancias con las que va a trabajar.
- Materiales nanoestructurados y nanotecnología: Se ha instruído al alumno en los fundamentos sobre los procedimientos de síntesis y fabricación de los actuales sistemas nanoestructurados y sus principales aplicaciones. Sistemas en los que se puede clasificar el sistema material objeto de este trabajo.
- Modelización, simulación y optimización de procesos químicos: El alumno ha visto reforzados sus conocimientos, de forma más eficaz, sobre la manipulación de datos de forma que pueda obtener modelos matemáticos que expliquen y simulen eficazmente el comportamiento de los procesos, pudiendo optimizarlo ahorrando el coste temporal y el económico que requiere la metodología experimental.
- Instalaciones de fluidos: Se han reforzado en el alumno los conocimientos adquiridos en el grado sobre el diseño de sistemas de bombeo; también sus conocimientos sobre la elección, mantenimiento y aplicación de diferentes elementos tales como bombas volumétricas, válvulas de regulación y otros elementos empleados en el trasiego de fluidos.
- Diseño avanzado de reactores I y II: Se han transmitido al alumno los fundamentos necesarios para el diseño de reactores poco convencionales y para la determinación de aquellas variables de operación que garantizan la mejor transferencia de materia, velocidad de reacción y grado de conversión química.
- Análisis de riesgo y seguridad en la industria: En esta materia se ha familiarizado al alumno con el riesgo intrínseco de las sustancias químicas. Se le ha enseñado a buscar en bases de datos historiales de accidentes, a modelizar cualquier posibilidad de riesgo en base a éstos históricos registrados para una instalación química dada.
- Dirección de proyectos: En esta materia se ha familiarizado al alumno con los conceptos necesarios de dirección de proyectos y, del mismo modo, con la elaboración de documentos formales de carácter vinculante; como el Pliego de Condiciones o el Presupuesto.

En base a las materias presentadas, el Máster de Ingeniería Química impartido por la Escuela Superior de Ingenieros Industriales de la Universitat Politècnica de València está capacitado para ofrecer soluciones dentro de un campo tan novedoso como es la Ingeniería Tisular además de, formar al alumno en un profesional muy versátil en diferentes campos de aplicación, desde labores de investigación en laboratorios a desarrollo como en el control y mejora de procesos en plantas industriales.

2.3. Justificación

Como se comentó anteriormente, la Ingeniería Tisular es un campo de estudio relativamente novedoso que tiene un elevado potencial para aportar soluciones a problemas médicos donde las terapias tradicionales son incapaces de actuar. El interés de realizar este trabajo radica en la potencial contribución que aporta este sector, al tratar de elaborar un sistema material que fomente la regeneración del tejido muscular esquelético dañado, bien por lesiones en éste o por enfermedades musculares, como las distrofias de *Duchenne* (afecta a 1 de cada 3.500 personas), la de *Becker* (afecta a 1 cada 18.450) personas) u otras enfermedades genéticas hereditarias de las que actualmente sólo se conocen tratamientos paliativos [45].

De obtener una membrana que permita una adecuada liberación del Boro (especie bioactiva en la que se centra el presente trabajo) se estudiará su viabilidad celular realizando cultivos de mioblastos (células precursoras del tejido del músculo esquelético) y ensayos de citotoxicidad.

Este proyecto se centra en analizar del sistema material obtenido y su morfología; en realizar estudios físico-químicos, térmicos, de su capacidad de liberación y de la degradación del material en condiciones que simulen el entorno fisiológico de un paciente.

Varios de los motivos que han llevado a elegir estos componentes han sido presentados en los antecedentes de este trabajo, siempre respaldados por la bibliografía.

Del mismo modo la justificación del uso de disoluciones auxiliares y de los materiales escogidos, que no hayan sido presentados previamente, se hará durante la explicación de las diferentes etapas del procedimiento experimental, siempre respaldado por argumentos y manteniendo un razonamiento crítico de los resultados obtenidos tanto por parte del estudiante como de la dirección del proyecto.

Es deber del alumno encargarse de planificar el diseño del experimento y de seguir en todo momento la evolución de éste, siempre respaldado por la dirección, analizando de forma crítica los resultados obtenidos en los procesos de caracterización y de los problemas que hayan podido surgir en el procedimiento experimental.

3. Normativa

Con el fin de desempeñar la ejecución del proyecto de forma correcta a la normativa vigente es necesario que el alumno tenga conocimiento de éstas. Cualquier actividad asociada a un laboratorio de síntesis y/o caracterización físico-química está sujeta a las siguientes normativas:

- R.D. 1369/2000, de 19 de julio, por el cual se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos de sustancias y productos químicos. Surge como modificación del R.D. 822/1993, de 28 de Mayo, en el que se adoptan las medidas necesarias para garantizar que los laboratorios que realicen ensayos sobre los productos químicos cumplan con los principios de buenas prácticas de laboratorio especificados en su anexo.
- R.D. 379/2001, de 6 de abril, donde se establece el reglamento de almacenamiento de los productos químicos, atendiendo a diferentes instrucciones técnicas complementarias a seguir en función de su clasificación (MIE-APQ, de los números 1 a 7). En dicho real decreto se incluyen anexos que indican cómo distribuir y manipular los diferentes tipos de sustancias atendiendo a sus características.
- R.D. 363/1995, de 10 de Marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre la declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. Dictado para incorporar la Directiva 67/548/CEE sobre a las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en cuanto a la clasificación, envasado y etiquetado así como las posteriores modificaciones u adaptaciones técnicas que se les hagan.
- R.D. 374/2001, de 6 de abril, sobre protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra riesgos relacionados con el uso de agentes químicos en el desempeño de su trabajo. Determina el cuerpo básico de garantías y responsabilidades necesario para establecer un adecuado nivel de protección de la salud de los trabajadores frente a los riesgos derivados de las condiciones de trabajo.
- R.D. 840/2015, de 21 de septiembre, por el que se aprueban las medidas de control de los riesgos inherentes a los accidentes graves con sustancias peligrosas. Abarca el R.D. 1196/2003, de 19 de septiembre. donde se detalla la Directriz básica de protección civil para el control y la planificación ante el riesgo de accidentes graves donde intervengan sustancias peligrosas.
- R.D. 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización, por los trabajadores, de equipos de protección individual. Este real decreto determina el cuerpo básico de garantías y responsabilidades necesarios que permitan establecer un adecuado nivel de protección de la salud de los trabajadores frente a los riesgos derivados de las condiciones de trabajo.

Fija las medidas mínimas que se deben adoptar para la adecuada protección del trabajador, incluyendo, en ellas, las destinadas a garantizar la utilización por parte de los trabajadores de los EPIs en sus respectivos puestos de trabajo.

- R.D. 952/1997, de 20 de junio, Modificación del Reglamento de la Ley 20/1986, de 14 de mayo, centrada en materia básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Se establece el régimen jurídico básico para garantizar la protección de la salud humana, del medio ambiente y de los recursos naturales en la realización de cualquier actividad de producción o gestión de residuos. Dictamina una clasificación de aquellos compuestos que presentan potencial riesgo dada su naturaleza química.
- Ley 22/2011, de 28 de julio, sobre residuos y suelos contaminados. Recoge aspectos generales en materia de contaminación; incluye definiciones y la lista europea de las sustancias declaradas como residuo. Se establece el régimen jurídico en cuanto a producción y gestión de residuos. Incluye medidas para evitar la generación de residuos que puedan suponer un potencial riesgo para el medio ambiente y la salud humana.

Además de las normas de obligatorio cumplimiento citadas, el alumno debe seguir otra serie de directrices.

4. Ámbito de aplicación y rango de soluciones del trabajo

4.1. Diseño del experimento

Un trabajo de investigación de esta envergadura ha requerido una etapa de planificación y organización previa para definir los objetivos del proyecto: qué características se desean conseguir en la membrana final, los materiales elegidos para su óptima aplicación y qué cantidad es la adecuada para conseguir concentraciones que permitan alcanzar las propiedades deseadas del sistema material objetivo. Así mismo se ha estipulado el número de réplicas por ensayo que se deben realizar para que tenga la suficiente representatividad estadística y establecer los plazos de entrega de los resultados e informes de progreso del proyecto.

Ya se comentó, anteriormente en los objetivos, que la finalidad de este proyecto es la de fabricar una membrana tridimensional empleando la técnica del *electrospinning coaxial* que permita, con la liberación de iones bioactivos de forma controlada, una futura aplicación en la regeneración del tejido muscular esquelético.

Encontrados aquellos parámetros viables para la producción de la membrana, se pretende estudiar la presencia de la especie de interés en el interior de las nanofibras mediante técnicas de espectroscopía, además de la cuantificación de su liberación en un medio que simule el entorno fisiológico con el fin de compararla a otros sistemas materiales elaborados con la misma finalidad.

De todas las morfologías en las que se podía presentar el sistema material de interés, la elegida fue la de un mallado tridimensional compuesto de nanofibras de ácido poliláctico, que ofrece una estructura nanoporosa con una elevada área superficial y permite la liberación de las especies bioactivas al medio así como la difusión de nutrientes celulares que aseguren la viabilidad celular en ese mallado. Se pretende establecer una comparación entre la capacidad de liberación del sistema al ser un mallado compuesto de nanofibras y, la que se produce en otros sistemas más convencionales como son membranas preparadas por el método de *solvent casting*.

Se pretende estudiar la capacidad de liberación además de la degradación del sistema material fabricado, sin llegar a realizar cultivos que permitan estudiar la viabilidad celular. En función de las conclusiones que se obtengan de este proyecto, será objeto de estudios posteriores.

Se ha escogido que la deposición de las nanofibras se haga sobre cubres de vidrio de 12 mm de diámetro debido a que son soportes que ofrecen una fácil reproducibilidad en los ensayos que se pretenden realizar, permitiendo ver de forma visual en un microscopio óptico si se han depositado las fibras y realizando un control del proceso de forma progresiva sin malgastar recursos económicos en comprobaciones posteriores de microscopía electrónica.

Los materiales escogidos, como se ha comentado previamente, han sido el ácido poliláctico y el boro. El primero se ha escogido por ofrecer una degradación hidrolítica lenta que permite una liberación controlada [15,22] y, al ser biocompatible, ya se ha utilizado en Ingeniería Tisular con anterioridad para regeneración de tejido óseo, cardíaco y neuronal [11,17, 19-20,22]. En segundo lugar se ha escogido el Boro como especie bioactiva porque, en las cantidades adecuadas, se ha demostrado que favorece el crecimiento de células del músculo esquelético [37].

4.2. Síntesis de membranas por solvent casting, spin coated y membranas electrohiladas

Acorde a lo expuesto previamente, se estudiará el sistema material empleando como polímero base el ácido poliláctico.

Se pretende establecer una comparativa de sus propiedades en función de cómo se haya formado el sistema polimérico; éste se ha elaborado utilizando tres técnicas diferentes: el *solvent casting*, el *spin coating* y el *electrospinning*.

- **Solvent Casting:**

Para la elaboración de los *solvent casting* de PLLA se ha partido de unas disoluciones de PLLA al 2 % g/L, de PLLA al 2 % con borato sódico decahidrato al 2 % (con respecto a la masa total del polímero) y otra de PLLA al 2 % g/L con borato sódico al 5 % (con respecto a la masa total del polímero).

Para la preparación de la disolución de PLLA se pesaron 2 gramos de granza de PLLA (PLLA *Cargill Dow*) y se diluyeron en 100 mL de cloroformo (*Scharlab*, extra puro estabilizado con etanol) dejándolo en agitación *overnight*.

La elaboración de la disolución de PLLA con boro al 2 % se realiza mezclando previamente los 100 mL de cloroformo con 40 mg de borato sódico decahidratado (*sodium tetraborate decahydrate, Mule Team Borax, UK*) seguido de una sonicación (*Homogeneizador ultrasónico HD3200, BANDELIN, Alemania*), durante 2 minutos sin temperatura, para asegurar la dispersión homogénea del borato sódico en la disolución. Pasado ese tiempo, se combina con 1,96 gramos de granza de PLLA y se deja en agitación *overnight* (figura13).



Figura 13. Sonicador Homogeneizador ultrasónico HAD3200 con campana aislante del ruido.

Para la elaboración de la disolución de bórax al 5%, el procedimiento es el mismo que para la disolución con un 2 % de borato sódico, pero las cantidades son 100 mg de borato sódico en 100 mL de cloroformo y 1,9 gramos de granza de PLLA.

Con las disoluciones ya preparadas, se vierten 27,7 mL de disolución en una placa *Petri* de vidrio de 9 cm de diámetro y se deja evaporar *overnight*.

Una vez que los *film* de polímero se encuentran secos, con ayuda de unas pinzas de laboratorio y de agua destilada, se extraen los *Solvent Casting* de PLLA y PLLA + Boro de las placas *Petri* (figura 14).

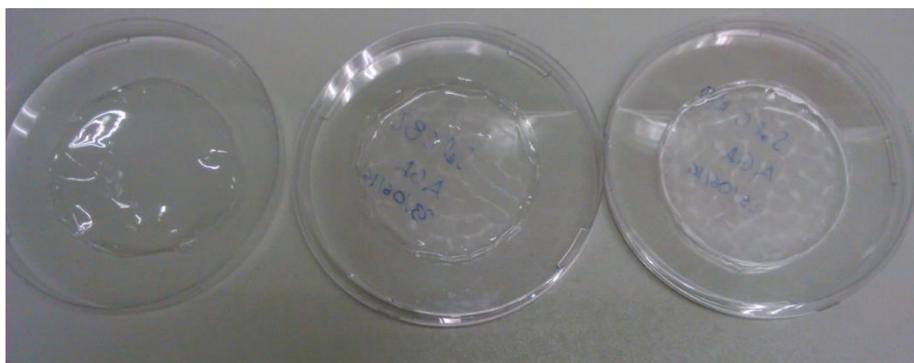


Figura 14. Films de PLLA elaborados por la técnica del *Solvent Casting*. El de la izquierda es sólo de PLLA, mientras que el central y el de la derecha tiene un contenido en Boro del 2 y del 5 % en peso relativo a la masa total de polímero.

A continuación los *films* se introducen en un desecador con temperatura y se dejan secar al vacío con extracción continua y 40°C. Finalmente, se troquelan discos de los diferentes tipos de *film* con un troquel de 12 mm de \varnothing .

- **Spin Coating:**

La técnica del *Spincoated* se emplea para elaborar recubrimientos poliméricos muy finos, con espesores de 200 nm. Para ello la técnica aprovecha el movimiento radial que se le aplica a una disolución cuando es depositada sobre un disco que gira a grandes velocidades, pudiendo crear películas poliméricas de espesores muy finos. El espesor final que se obtiene depende de la reología de la disolución polimérica y de la velocidad de rotación aplicada para esparcir el polímero por la fuerza centrífuga y para evaporar el disolvente.

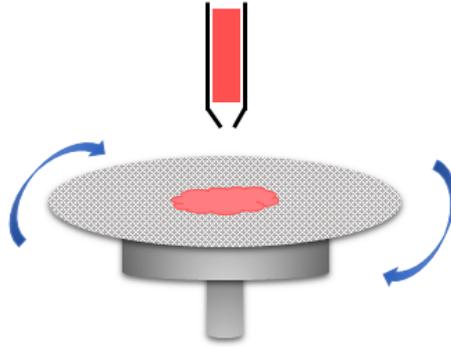


Figura 15. Esquema funcional de la técnica del Spin Coated. La disolución polimérica se vierte sobre el soporte giratorio que rotará a elevadas velocidades.

Para la elaboración de los *Spin Coated* se ha empleado un equipo *Spin Coater CEE^R200X* (figura 16). Previamente se deben activar el nitrógeno, para darle una atmósfera inerte, y la bomba de vacío, para asegurar la sujeción de cubres de vidrio de 12 mm de diámetro. Una vez asegurada la sujeción del cubre de vidrio, se vertieron 100 μ L de la disolución de PLLA al 2 % con cloroformo, y se le aplicó una velocidad de rotación de 3000 rpm durante 30 segundos. Los cubres de vidrio, con la película de PLLA ya añadida, se dejaron al vacío durante 4 horas y temperatura ambiente.



Figura 16. Spin coater modelo CEE^R 200X conectado a un sistema de vacío en una cabina con atmósfera inerte (N₂)

- **Electrospinning:**

Para la elaboración de las nanofibras de PLLA se empleó una disolución de PLLA al 8 % p/v empleando como disolvente Hexafluoroisopropanol (*HFIP, Sigma-Aldrich*). Se pesaron los gramos de grana de PLLA y se diluyeron en mL del disolvente. Para la elaboración de las nanofibras rellenas se empleó, paralelamente, una disolución acuosa de bórax al 10 % p/v.

En la producción de las nanofibras con una *orientación* aleatorias se ha trabajado con un colector plano formado por una placa de cobre recubierta de papel de aluminio con un contorno de teflón para focalizar las fibras emitidas en una región determinada.

Para facilitar la visualización posterior de las fibras y la normalización de las superficies de membrana estudiada se adhirieron, con papel “cello”, los cubres de vidrio al colector (figura 17) tal como se expuso en el punto anterior Diseño del experimento. Dicho colector se ubica en posición vertical para evitar posibles daños sobre la membrana por caída accidental de disolvente sobre la superficie de recolección de fibras.

Para la producción de las nanofibras con una orientación alineada se empleó un colector rotatorio consistente en un soporte ensamblado a un motor eléctrico (*WINE 356 WIG*) para darle la rotación necesaria (figura 17). En este tipo de colector se plegó una tira de papel “cello” alrededor del colector de forma que la cara adhesiva enfocará al ambiente pudiendo pegar los cubres de vidrio.



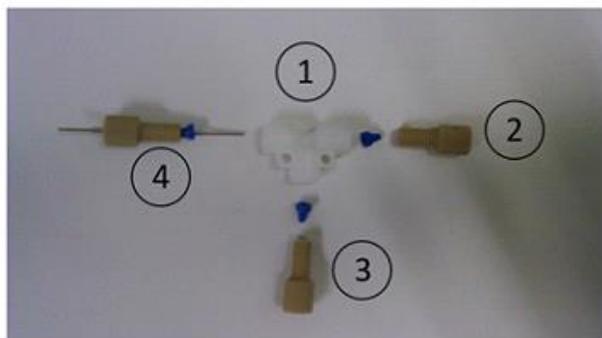
Figura 17. Collectores *home-made* para el *electrospinning*. A la izquierda, un colector plano recubierto de una lámina de teflón (nanofibras *Aleatorias*). A la derecha dos colectores rotatorios (nanofibras *alineadas*): el primero de poliestireno, perforado por un tornillo, empalmado con hilo de cobre y recubierto de papel de aluminio para volverlo un material conductor que atraiga las nanofibras y, el segundo, es íntegramente de latón por lo que ya aporta conductividad al material base.

Los parámetros obtenidos para la producción de fibras fueron los siguientes (Tabla 3):

Tabla 3. Parámetros experimentales obtenidos para la producción de nanofibras de PLLA únicamente.

Orientación	ALEATORIAS	ALINEADA
Caudal (mL/hr)	1	1
Voltaje aplicado (kV)	6,3	10,2
Distancia (cm)	7	3
Colector	Plano Rotatorio a muy baja frecuencia	Rotatorio
Frecuencia del motor eléctrico (Hz)	3	55

Como se comentó anteriormente en la introducción, el *electrospinning* coaxial permite la producción de nanofibras rellenas mediante la circulación simultánea de dos fluidos inmiscibles entre sí, uno por la corona externa y aportará el envoltorio polimérico y el otro por un conducto interno, de forma que quede encapsulado por el polímero cuando se produce la nanofibra. Para lograr la unión de ambos fluidos de forma concéntrica en la boca de salida se ha empleado un *nozzle coaxial*, que permite la unión de conductos diferentes en una salida única (figura 18). El campo eléctrico aplicado deformará la gota perteneciente a la solución polimérica y su posterior estiramiento arrastrará la solución acuosa en su interior, dando lugar a una nanofibra rellena



- LEYENDA:**
- 1) Unión en T
 - 2) Entrada a aguja interna
 - 3) Entrada a corona externa
 - 4) Salida de agujas concéntricas

Figura 18. *Nozzle* coaxial que permite el trasiego simultáneo de dos fluidos. Uno entra por la entrada 2 y circula por la aguja pequeña de la salida 4. La entrada 3 da lugar a que la solución polimérica envuelva la aguja pequeña, de forma que en la salida 4 la disolución polimérica rodea a la disolución acuosa.

Para la impulsión de las dos disoluciones se han empleado dos bombas de jeringa, haciendo circular ambos fluidos a través de conducciones de teflón. El montaje resultante queda como se muestra a continuación (figura 19):



- LEYENDA:**
- 1) Bomba de jeringa
 - 2) Colector rotatorio
 - 3) Motor eléctrico
 - 4) Fuente de alta tensión
 - 5) Pinza de cocodrilo
 - 6) *Nozzle* coaxial

Figura 19. Montaje experimental del sistema de *electrospinning* coaxial para la producción de nanofibras alineadas rellenas de disolución de boro al 10%.

De esta forma, tal y como se explicó en la introducción, se consigue que por la corona exterior circule la disolución polimérica, y por el conductor interior, fluya la solución acuosa con el boro.

Empleando los mismos tipos de colectores los parámetros empleados para conseguir producir fibras han sido los siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Parámetros experimentales obtenidos para la producción nanofibras de PLLA rellenos de disolución acuosa de Boro al 10 % por *electrospinning* coaxial.

Orientación	ALEATORIAS	ALINEADA
Caudal externo (mL/hr)	0,7	0,7
Caudal interno (mL/hr)	0,5	0,5
Voltaje aplicado (kV)	7,3	6
Distancia (cm)	7	3
Colector	Plano Rotatorio a muy baja frecuencia	Rotatorio
Frecuencia del motor eléctrico (Hz)	3	55

Una vez depositadas las fibras se les realizó un tratamiento térmico; dicho tratamiento consiste en anclarlas en un molde de teflón (figura 20) e introducir las en una estufa a 60 °C durante 20 minutos para asegurar la adherencia de las fibras entre ellas.

De no proceder así se ha comprobado, experimentalmente en este trabajo, que en los ensayos en inmersión las fibras se disgregaban obstaculizando su correcta caracterización.

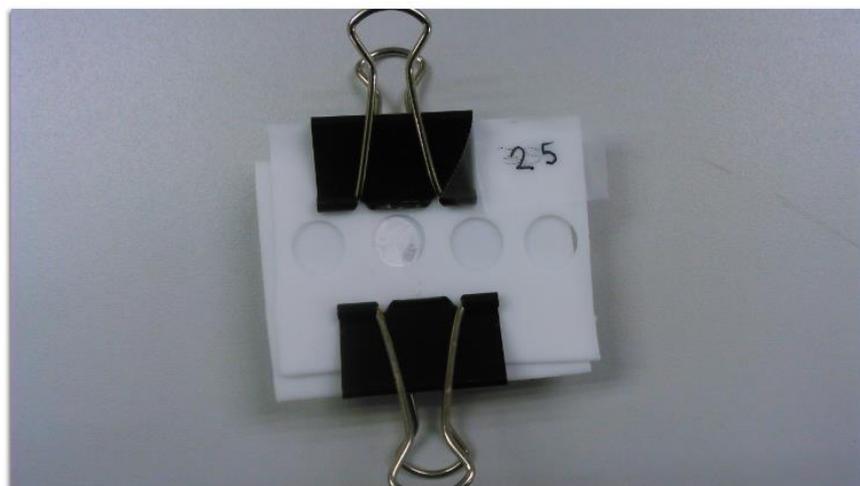


Figura 20. Montaje del soporte de los cubres de vidrio para realizar el tratamiento térmico a las nanofibras

4.3. Caracterización microscópica

Durante la elaboración de las nanofibras se ha ido observando en el microscopio óptico (*NIKON modelo TS100*) la conformación espacial de las fibras obtenidas, permitiendo llevar un breve y sencillo proceso de control de la membrana que se iba fabricando.

Con el fin de analizar con más detenimiento la morfología de la membrana y dada la necesidad de más aumentos que los que puede proporcionar un microscopio óptico, se ha recurrido a observar la membrana electrohilada en un microscopio electrónico de Barrido de Emisión de Campo (*FESEM*) del servicio de microscopía electrónica de la UPV. Finalmente, con el propósito de comprobar de una manera visual si se ha conseguido el objetivo de conseguir nanofibras rellenas, se han observado las fibras elaboradas por *electrospinning coaxial* al microscopio electrónico de transmisión (*TEM*), igualmente, del servicio de microscopía.

A continuación se muestra una imagen de los equipos empleados para realizar la caracterización microscópica de la membrana electrohilada (figura 21).

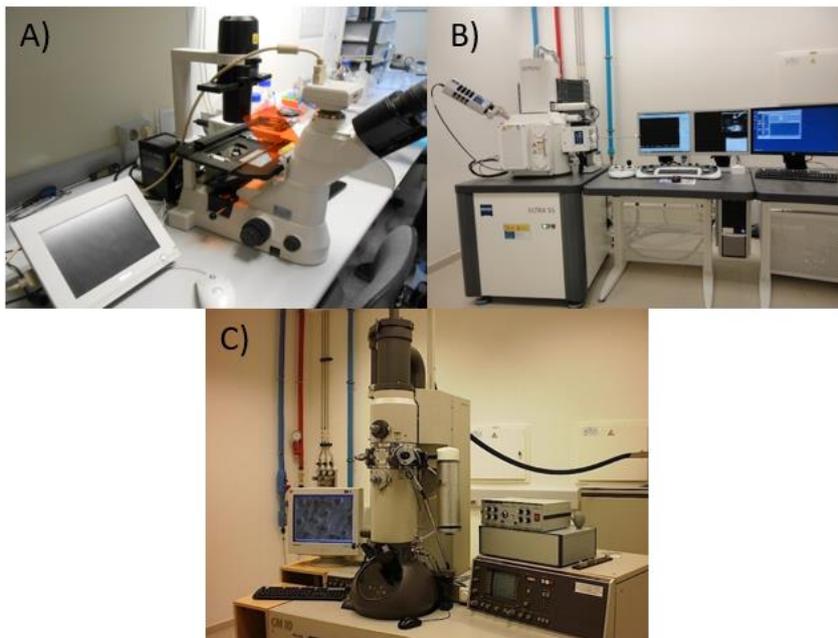


Figura 21. Equipos empleados para la etapa de caracterización microscopía en este TFM. En la figura 20 a) se encuentra el *microscopio óptico NIKON TS100* perteneciente al Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular. Las figuras 20 b) y 20 c) muestran el *FESEM* y el *TEM* pertenecientes al servicio de microscopía de la UPV.

4.4. Caracterización físico-química

- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):

La radiación infrarroja es la que se encuentra a una longitud de onda superior a la del espectro visible (700 nm a 1 mm). La absorción de radiación infrarroja induce en las moléculas cambios vibracionales.

En las zonas de espectro infrarrojo medio (2,5 μm -50 μm) y lejano (50 μm -1000 μm) la frecuencia de la vibración de los enlaces en la molécula y la de la luz absorbida son iguales. Este fenómeno produce que los momentos dipolares de las moléculas cambien durante la vibración.

La posición de la absorción en la banda infrarroja depende de las masas vibratorias que componen la molécula, del tipo de enlace, de la posición de grupos dadores o aceptores de electrones y de las interacciones secundarias con otros grupos moleculares. La intensidad de la señal de absorción es mayor cuanto mayor es la polaridad en los enlaces vibrantes [46].

El espectrofotómetro de infrarrojos por transformada de Fourier, para alcanzar también las zonas de espectro lejano, emplea un *interferómetro de Michelson*.

Este dispositivo consiste en un láser en la zona del infrarrojo que es enviado a un divisor que separa el haz en dos partes iguales. Una de las partes es reflejada hacia un espejo fijo y la otra se transmite a un espejo móvil, recombinándose los dos haces en la pantalla de observación, tal como se muestra en la figura 22. La diferencia de fase entre ambos haces se mantiene constante [47].

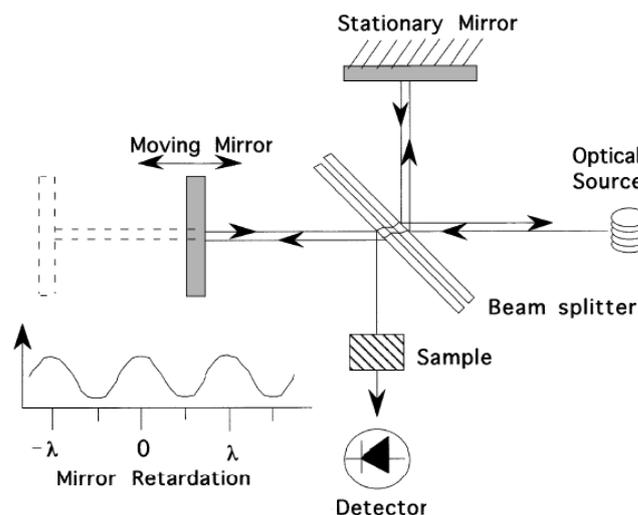


Figura 22. Esquema funcional de un interferómetro de *Michelson*. Imagen extraída de [47]

Aplicándole la transformada de Fourier al interferograma resultante, da como resultado un desfase que es propio de cada especie química.

El modelo empleado en este trabajo es el *espectrofotómetro modelo Tensor 27* de la casa comercial *Bruker* que se muestra a continuación en la figura 23.



Figura 23. Espectrofotómetro infrarrojo *Tensor 27* empleado en la caracterización química de los soportes materiales fabricados.

Las condiciones que se implementaron en el software del equipo para las medidas fueron las siguientes (Tabla 5):

Tabla 5. Parámetros de medida implementados en el equipo para la caracterización química por espectroscopia infrarroja.

Barridos	128
Resolución de medida	16 (7,714 cm^{-1})
Rango de número de onda (cm^{-1})	650-4000
Temperatura de medida	Ambiente
Distancia (cm)	7
Modo de lectura	Transmitancia

- **Ángulo de contacto:**

Con la técnica del ángulo de contacto se pretende evaluar la energía superficial de un material. Para ello se deposita una gota de un determinado fluido sobre la superficie del material y en función de que sea hidrófilo o hidrófobo tendrá mayor o menor mojabilidad, dando un menor o mayor ángulo de contacto respectivamente.

Para la elaboración de este TFM se ha empleado un *equipo de ángulo de contacto OCA 15* de la casa comercial *DATAPHYSICS* (figura 24). Se ha empleado como fluido, agua miliQ en gotas de 5 microlitros, asegurando el mismo tamaño de gota, y se ha evaluado el ángulo 10 segundos después de la deposición de la gota en la superficie del material.

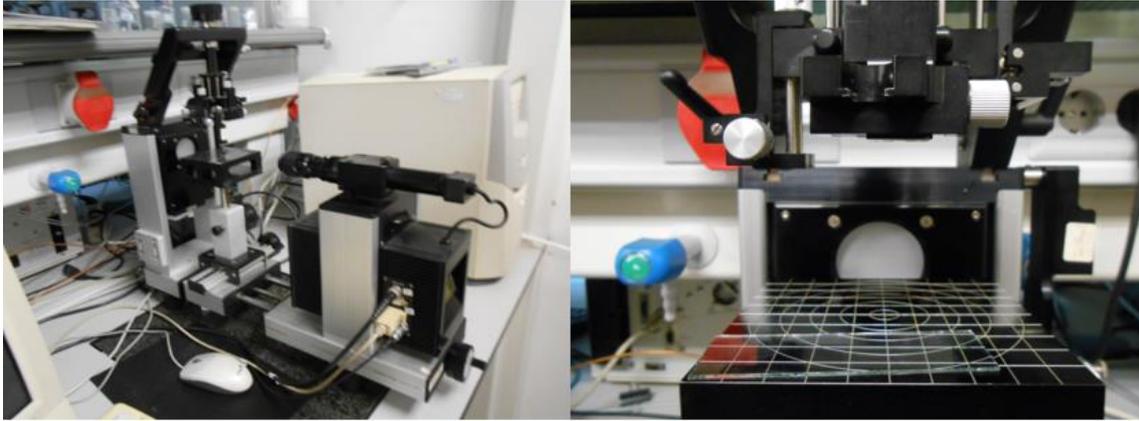


Figura 24. Equipo de medida del ángulo modelo OCA15 de la casa DATAPHYSICS.

4.5. Caracterización térmica

- **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica analítica empleada para estudiar cómo varían las propiedades térmicas de un polímero en función de la temperatura. Calentando simultáneamente dos cápsulas (una vacía y otra con la muestra polimérica) va registrando la diferencia del calor aportado a cada una para que estén a la misma temperatura. Dicha diferencia es registrada en un termograma, gráfico que aporta información acerca de los cambios que sufre el polímero en el rango de temperatura estudiado. Entre dichos cambios se encuentran la transición vítrea del polímero (cambios en la pendiente) y la fusión de los cristales de polímero (representado por uno o varios picos de calor aportado) [48].

Para la ejecución de este TFM se ha empleado un *DSC modelo 823e* de la casa *Mettler-Toledo* (figura 25) con el cual se ejecuta el siguiente programa de temperaturas:

- Un primer calentamiento de 20 °C a 200 °C a una velocidad de 10 °C/min para eliminar el envejecimiento físico de la muestra (cambios producidos en sus propiedades por el transcurso del tiempo) y fundir los cristales que pudieran haber.
- Enfriamiento posterior de 200 °C a 20 °C, a una velocidad de enfriamiento de 10 °C/min, para devolver el polímero a las condiciones iniciales.
- Un segundo calentamiento de 20 °C a 200 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, para determinar la transición vítrea del polímero una vez se ha eliminado el envejecimiento físico [48].



Figura 25. Calorímetro diferencial de barrido modelo 823e de Mettler-Toledo.

- **Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis termogravimétrico es una técnica de caracterización térmica que pretende estudiar la degradación térmica de un material. Para ello incrementa progresivamente la temperatura mientras que una termobalanza mide las variaciones másicas que experimenta la muestra de material, dando como resultado una curva de pérdida másica y el peso de los residuos finales.

Para este estudio se ha empleado un *equipo de TGA Mettler-Toledo* (figura 26). En el caso particular de este trabajo se analiza el cambio sobre el material en un rango de temperaturas de 50 °C a 900 °C en incrementos de 10 °C/min sobre pocillos de Platino.



Figura 26. Equipo de termogravimetría TGA/DSC2 de Mettler-Toledo.

4.6. Estudio de la liberación de las especies bioactivas

Para ello se introdujeron 3 réplicas de cada sistema material contenedor de Boro (*Solvent Casting de PLLA, solvent casting de PLLA con boro al 2 y al 5 %*, nanofibras *Aleatorias y alineadas rellenas* de la solución acuosa al 10 % de Borax) en una placa multipocillos p24. Se vertió 1 mL de agua miliQ para proporcionar el medio de liberación y se fueron extrayendo muestras de 40 μ L a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180 minutos y de 1 mL en los días 1, 3, 5 y 7. En los *time points*, a partir de 1^a día, se renueva el medio de liberación para evitar que se alcance una concentración de equilibrio que impida o frene la difusión del bórax del interior de las nanofibras.

Posteriormente se introdujeron alícuotas de 40 μ L de todas las muestras obtenidas en una placa multipocillo p96 y se les añadió 40 mL de un *Buffer* de acetato de potasio (preparación en anexo) y 20 mL de una disolución de azometina (preparación en Anexo). Se dejó que la azometina reaccionase con el Boro durante 1 hora y posteriormente se realizó la colorimetría en un *espectrofotómetro multiple VICTOR3 de la casa comercial Perkin-Elmer (figura 27)* a 405 nm durante 1 segundo.



Figura 27. Espectrofotómetro de placas múltiples VICTOR3 de Perkin-Elmer

4.7. Estudio de la degradación de los soportes materiales

Se persigue cuantificar la pérdida de masa del ácido poliláctico y estudiar si la forma en la que se presente dicho material afecta en la velocidad de degradación. Para cuantificar dicho extremo se prepararon 3 réplicas de cada material realizado con PLLA y se introdujeron en una placa multipocillos p24 donde se añadió a cada pocillo 1 mL de agua miliQ. A continuación se presenta un esquema de la placa con las respectivas muestras.

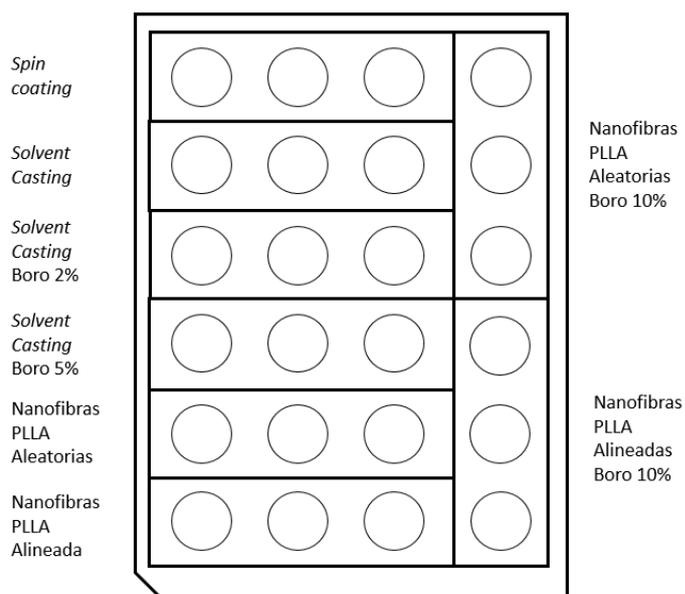


Figura 28. Esquema de la disposición de las muestras en una placa multipocillos p24 para el ensayo de degradación hidrolítica.

El estudio se ha hecho durante un mes, pesando las muestras cada semana para cuantificar la pérdida de masa.

Para ello se les retiraba, antes de cada pesada, el medio de degradación y, a continuación, se ponían al vacío con extracción continua el tiempo suficiente para asegurar la eliminación del agua que se quedara retenida en los materiales. Una vez pesadas las muestras se reponía el medio de degradación.

Pasado el tiempo de estudio la morfología de las membranas se evaluó con el *FESEM* para visualizar el efecto que la degradación había tenido sobre las membranas electrohiladas.

4.8. Análisis estadísticos

Para la realización de los análisis estadísticos se ha empleado el *Statgraphics Centurion XVI.I*. Después de cada discusión de resultados se incluirá una tabla resumen de un Análisis de la Varianza (*ANOVA*) para estudiar la influencia de cada factor modificado en las variables estudiadas en cada ensayo.

5. Presentación y discusión de resultados

5.1. Caracterización microscópica

Durante toda la etapa de elaboración de la membrana electrohilada se practicaron varias observaciones al microscopio óptico para comprobar si se estaban consiguiendo las disposiciones espaciales de las fibras perseguidas. A continuación, en la figura 29, se presentan varias imágenes de los diferentes tipos de fibras que se han elaborado, tanto para la conformación aleatoria como para las nanofibras alineadas.

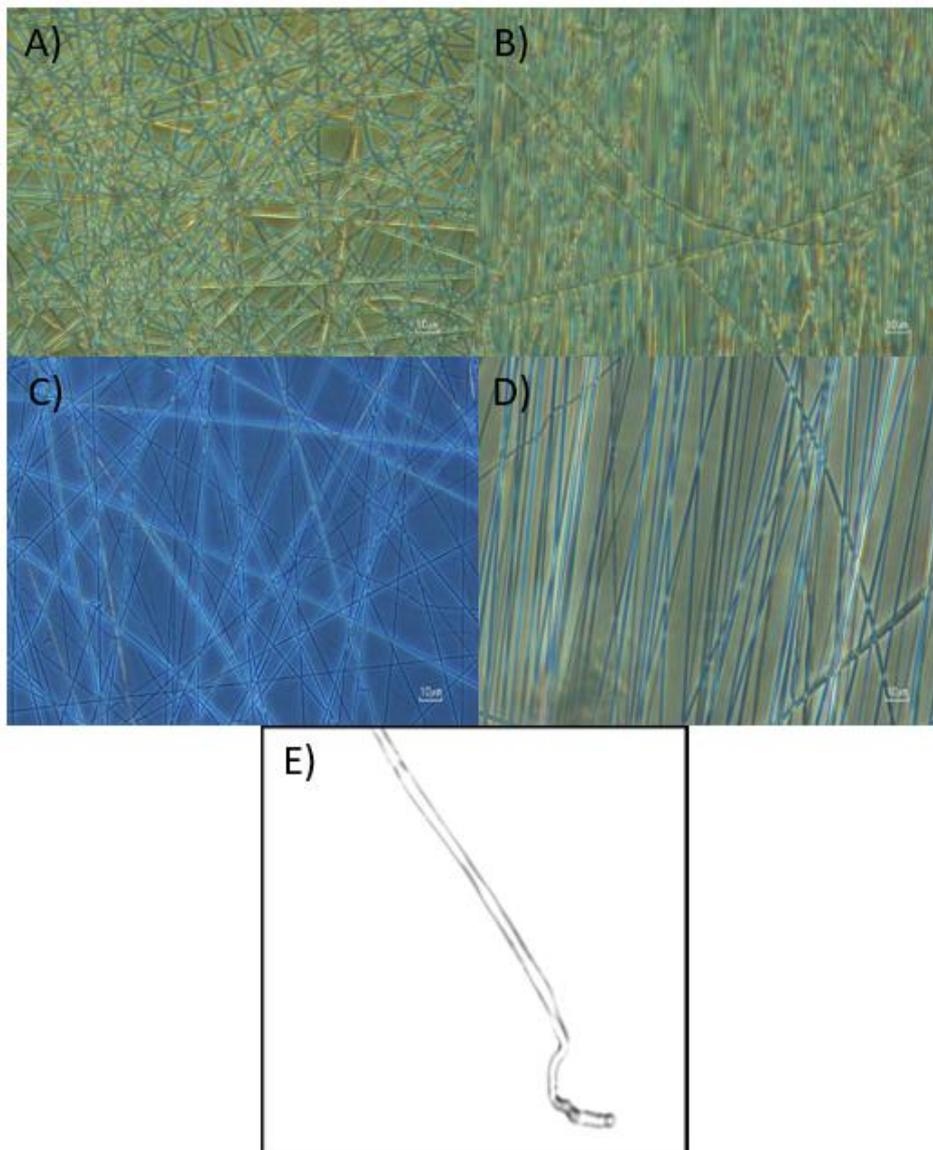


Figura 29. Fotografías a 40 aumentos de las membranas electrohiladas en el microscopio óptico. La figura 29 a) pertenece a nanofibras aleatorias realizadas por *electrospinning* convencional. La 29 b) pertenece a nanofibras de PLLA con orientación alineada. Las fotografías 29 c) y 29 d) corresponden a nanofibras rellenas de Boro en disposición aleatoria y alineada respectivamente. La figura 29 e) muestra una nanofibra rellena aislada en un borde del cubre objetos que se puede observar en el microscopio.

Se observa en las imágenes la diferencia entre haber empleado un tipo de colector u otro. Las nanofibras aleatorias presentan una distribución totalmente aleatoria, dando lugar a un entramado tipo tela de araña. Igualmente, se observa como las *alineadas* presentan una distribución/alineación clara aunque no perfecta, dadas las vibraciones que experimentaba el colector cuando el motor adquiría velocidades de giro muy elevadas.

Respecto a haber obtenido nanofibras rellenas o no, se puede percibir en las fotos de la figura 29 c) y 29 d) - que, para el mismo aumento, el tamaño de las nanofibras de PLLA realizadas con *electrospinning coaxial* es mayor al de las análogas obtenidas con *electrospinning simple*. Dicho aumento de tamaño y la aparente oquedad que tiene la nanofibra de la fotografía 29 e) abre la posibilidad de que se hayan obtenido fibras rellenas (o huecas). Para poder confirmarlo, se deberá realizar un estudio de liberación que lo corrobore.

Con el fin de estudiar la estructura del entramado de nanofibras con una resolución superior a la que puede aportar un microscopio óptico, se observaron las nanofibras rellenas con el bórax en el microscopio electrónico de barrido de emisión. Se presentan a continuación, en la figura 30, las fotografías realizadas a diferentes aumentos.

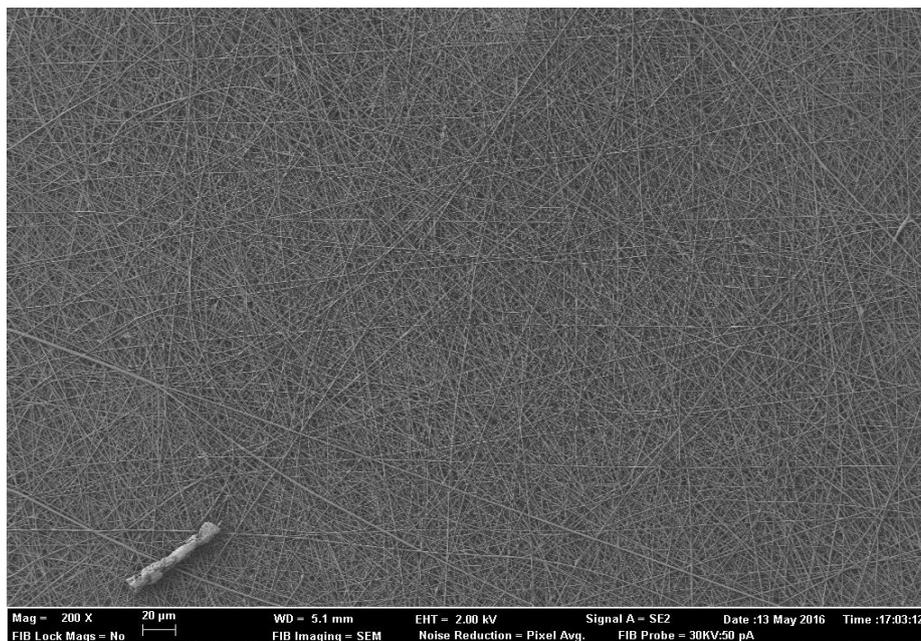


Figura 30. Fotografías FESEM a 200 aumentos de las nanofibras rellenas en disposición aleatorias.

Se puede apreciar, de una forma mucho más precisa, que las nanofibras han adquirido una disposición totalmente aleatoria dando lugar a una red tridimensional. Se puede apreciar, de manera aún más detallada, la organización que han adquirido las nanofibras en las figuras 31 y 32.

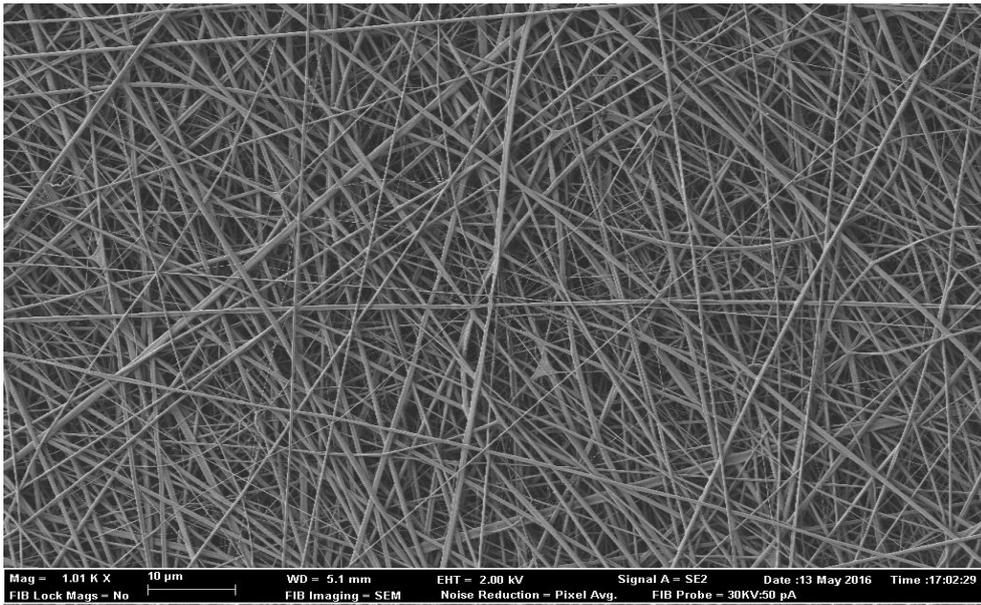


Figura 31. Fotografías FESEM a 1010 aumentos de las nanofibras rellenas en disposición aleatorias.

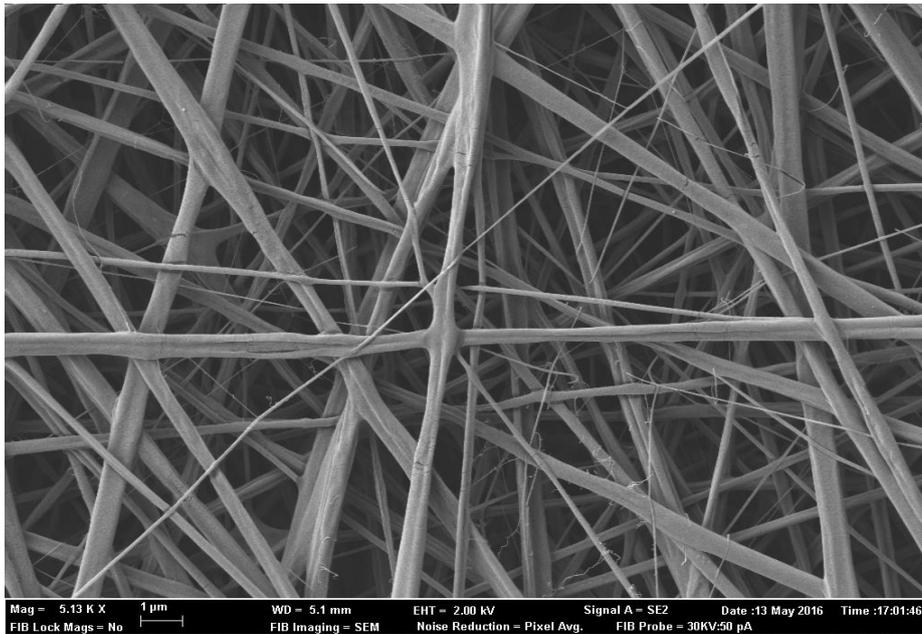


Figura 32. Fotografías FESEM a 5130 aumentos de las nanofibras rellenas en disposición aleatorias.

En la fotografía FESEM de la figura 31 se observa como diferentes fibras se han unido. Dicho fenómeno podría estar explicado por el tratamiento térmico que se realizó después de la fabricación de las membranas electrohiladas. Para analizar con más detenimiento se realizó una captura más en uno de estos puntos de unión de las fibras (figura 33).

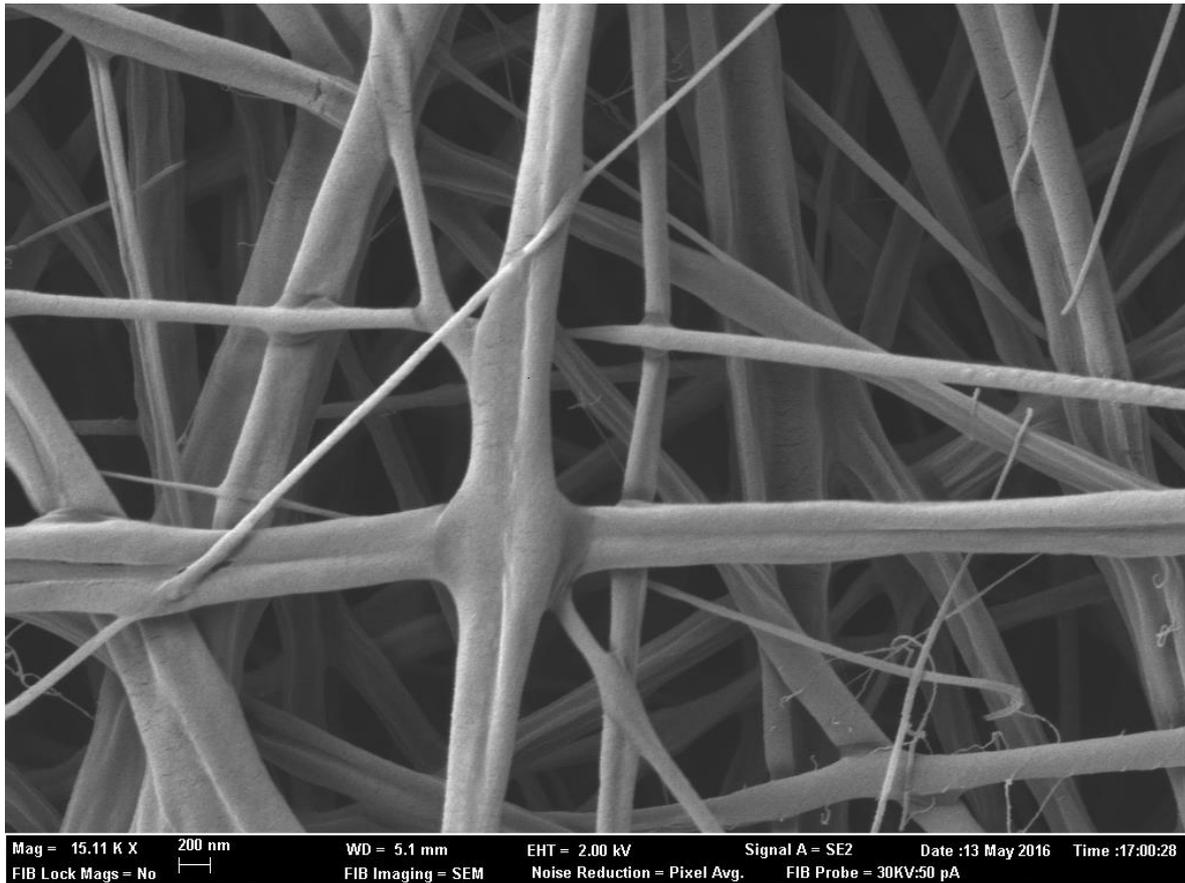


Figura 33. Fotografías FESEM a 15110 aumentos de las nanofibras rellenas en disposición aleatorias.

En esta última captura se visualiza la unión entre las nanofibras; comparten puntos de anclaje e incluso algunas nanofibras parecen haberse adherido en gran parte de su extensión.

De forma análoga se han observado las nanofibras cuando se ha elaborado la membrana con el colector rotatorio. Aunque ya se podía detectar la alineación, en las fotografías del microscopio óptico, se estudió también la morfología de la membrana electrohilada cuando se le dió esta configuración. A continuación se muestran las fotografías FESEM en la figura 34.

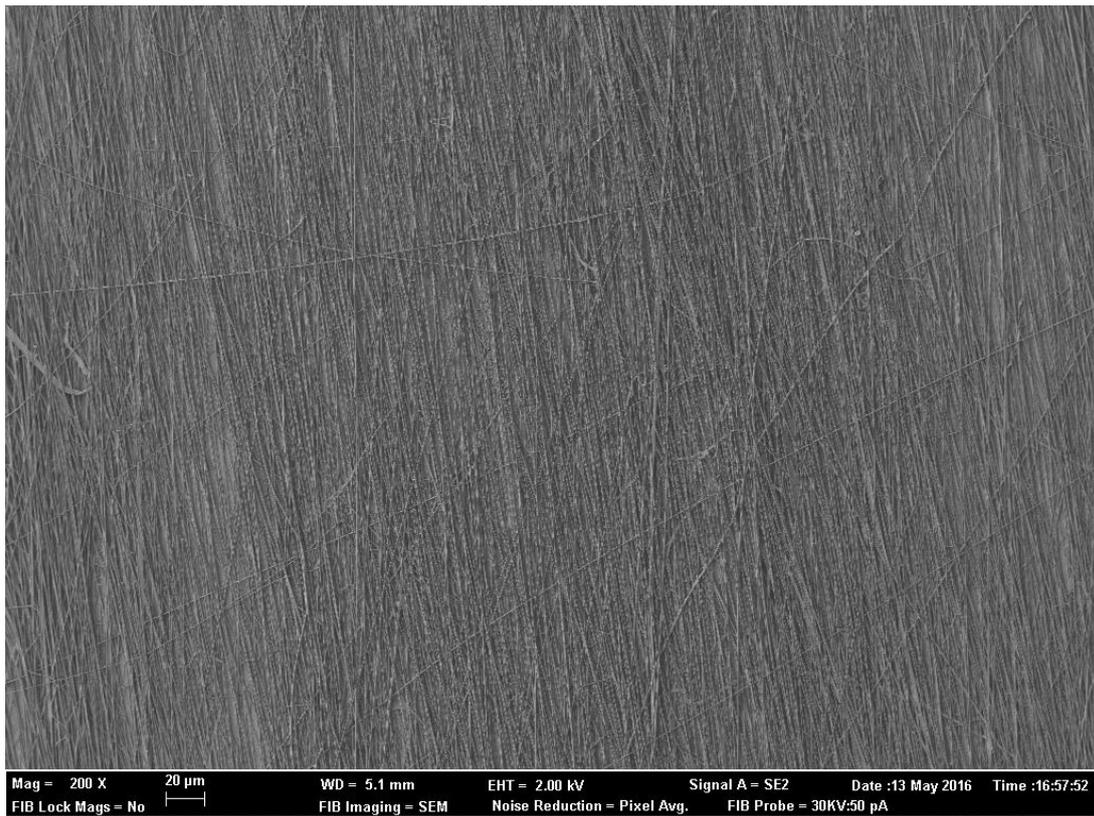


Figura 34. Fotografías FESEM a 200 aumentos de las nanofibras rellenas cuando están alineadas en una misma dirección.

Se observa que, en esta ocasión, las nanofibras presentan en su mayoría una alineación hacia una determinada dirección. Sin embargo, como se dijo anteriormente, las vibraciones del colector han influido en la ordenación espacial de las nanofibras. Si bien este fenómeno no parecía suponer un inconveniente a efectos macroscópicos porque el sistema ha funcionado y se ha logrado hacer las nanofibras, a efectos microscópicos ha impedido alcanzar una alineación perfecta completamente.

Otro detalle a tener en cuenta es que, en las capas más superficiales de la membrana, aparecen fibras sueltas que rompen esa tendencia a ordenarse en una determinada dirección; esto, probablemente, se produce durante la etapa de inactividad en la producción de fibras. Al bajar la velocidad de giro del motor algunas fibras sueltas se vieron atraídas por el voltaje residual al cargarse los equipos y se adhirieron de forma aleatoria.

Para poder observar de forma más precisa la alineación de las nanofibras se realizaron capturas a 1010 y 5130 aumentos; dichas capturas se exponen a continuación en las figuras 35 y 36.

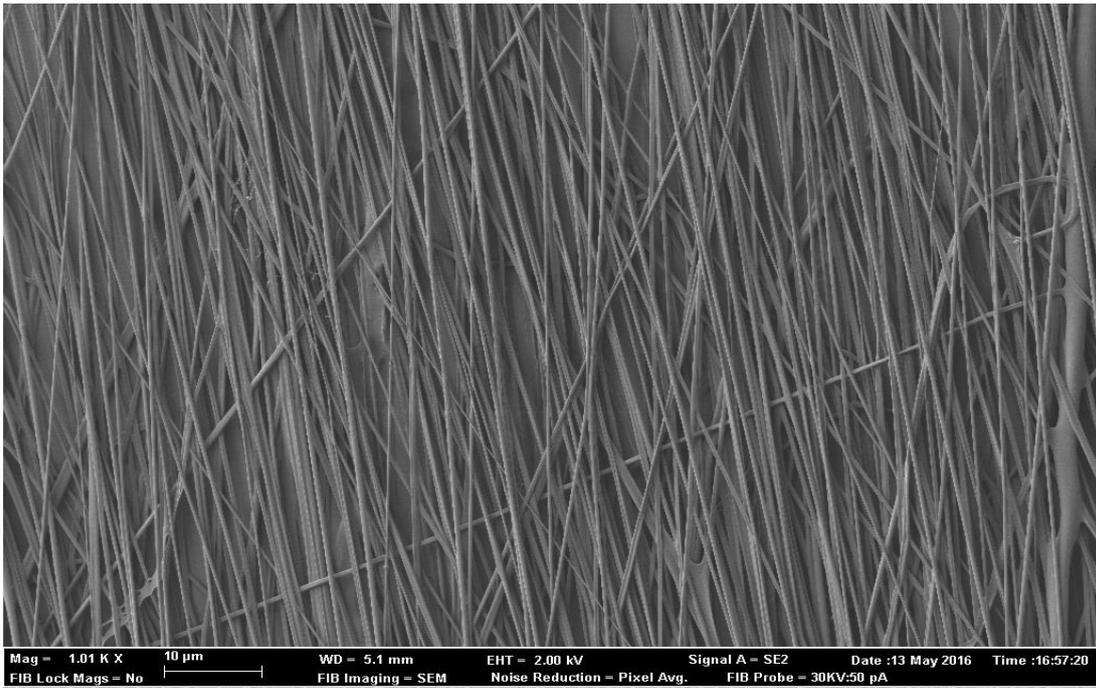


Figura 35. Fotografías FESEM a 1010 aumentos de las nanofibras rellenas cuando están alineadas en una misma dirección.

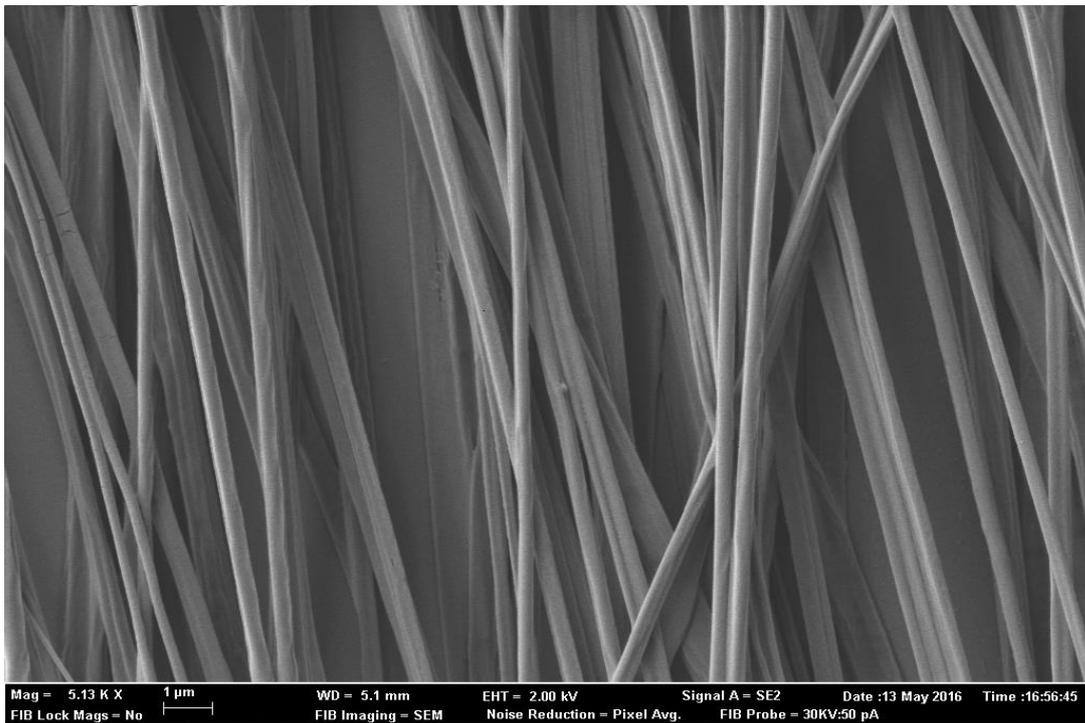


Figura 36. Fotografías FESEM a 5130 aumentos de las nanofibras rellenas cuando están alineadas en una misma dirección.

De forma muy similar a lo observado en el caso de las nanofibras aleatorias, se percibe lo que parecen uniones de fibras. Por ello se hizo una última captura de *FESEM* a 15130 aumentos que se muestra en la figura 37.

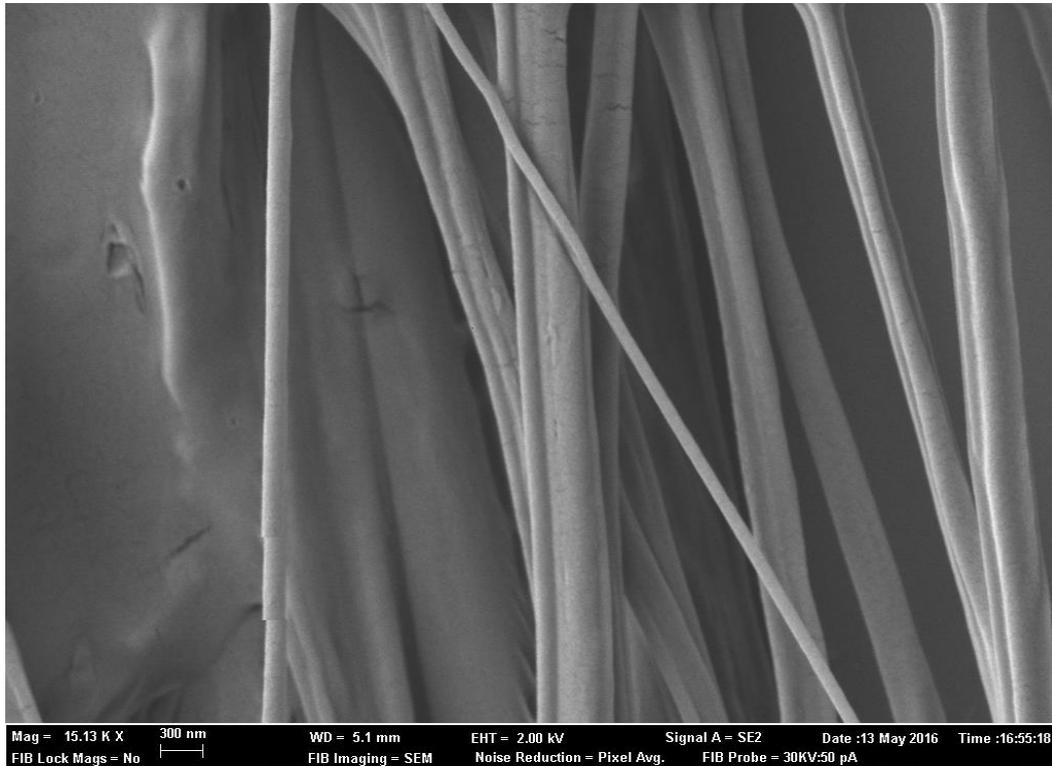


Figura 37. Fotografías *FESEM* a 15130 aumentos de las nanofibras rellenas cuando están alineadas en una misma dirección.

Se observa la adhesión de fibras entre sí. Como se expuso anteriormente puede ser debido al tratamiento térmico que se realizó en la etapa posterior al electrohilado. En esta ocasión da lugar a agrupaciones de nanofibras formando nanofilamentos aún más grandes.

Aunque se ha estudiado la morfología de la membrana electrohilada para ambas orientaciones espaciales con microscopía óptica y electrónica, aún no se tiene la convicción de que se haya conseguido el objetivo de formar nanofilamentos rellenos.

Se observaron las fibras en el *TEM* con el fin de que, al aumentar la resolución y el potencial aplicado, se pudiera observar si las nanofibras estaban huecas. A continuación se muestran algunas de las capturas realizadas con el *TEM* (figura 38).

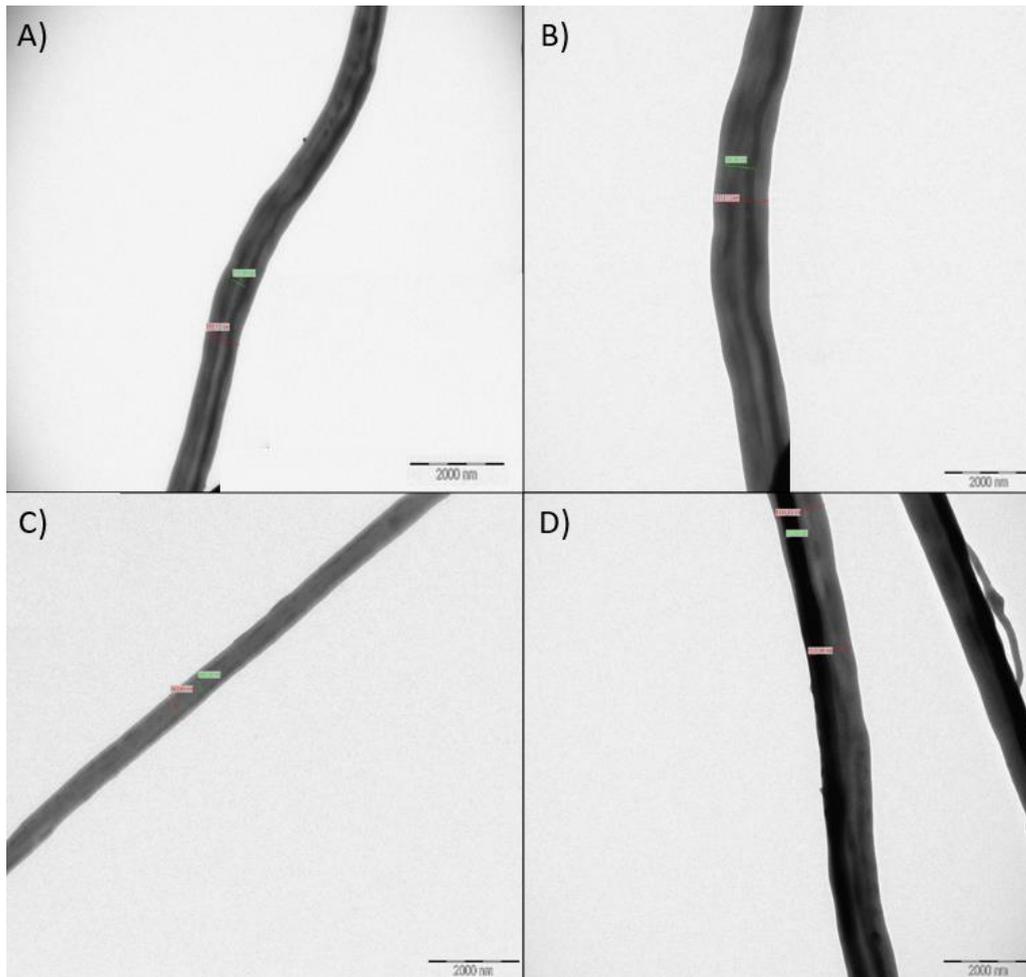


Figura 38. Fotografías TEM de las nanofibras producidas con *electrospinning* coaxial.

En las imágenes TEM se observa, en las fibras monitorizadas, un contraste de imagen dentro de los nanofilamentos que probablemente sea debido a que el haz de electrones del TEM ha encontrado menos cantidad de material a traspasar. Que este contraste aparezca en varias imágenes sugiere que, con esta técnica, se han conseguido producir nanofibras rellenas; aunque eso se analizó en más profundidad en el estudio de la liberación.

5.2. Caracterización físico-química

- FTIR:

Con las condiciones anteriormente expuestas se ha obtenido el siguiente gráfico (figura 39) de la transmitancia medida en el espectro de absorción infrarroja.

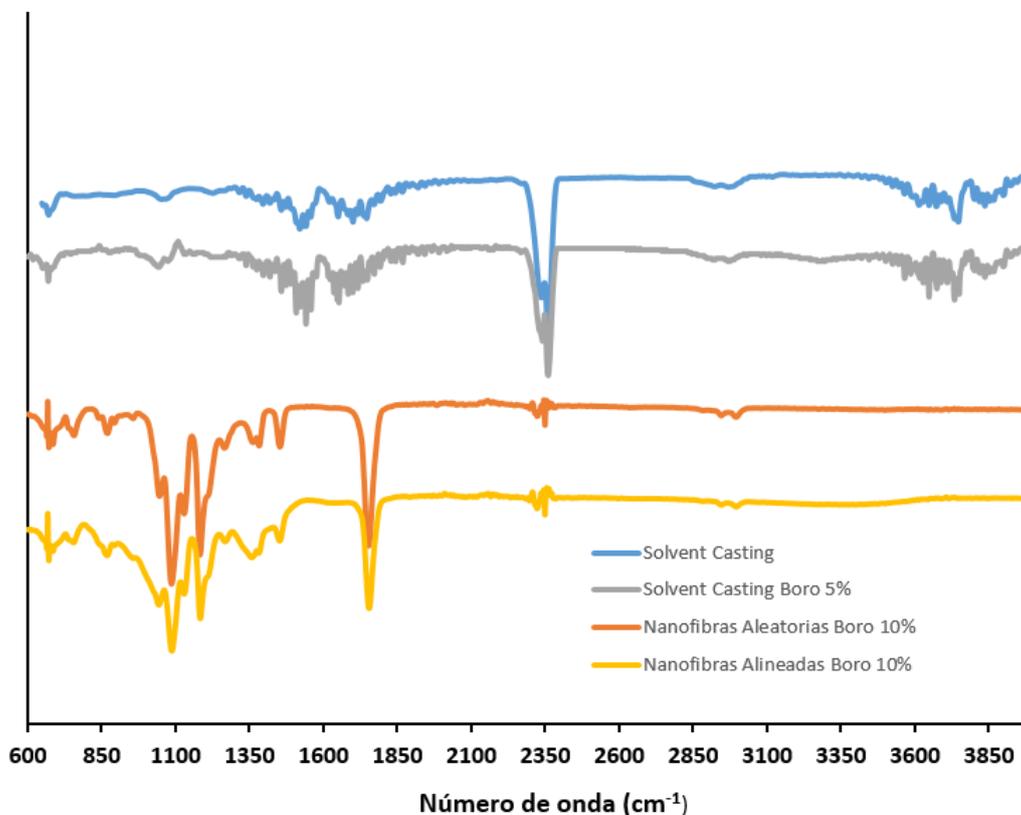


Figura 39. Gráfico de la transmitancia frente al número de onda en el espectro de absorción infrarroja.

Se observa en el gráfico que aparece en las especies con Boro un pico próximo a 650 cm^{-1} que es característico de la deformación que se da en los enlaces B-O por la vibración [49]. Se observa también una banda débil en torno a 885 cm^{-1} que es propia de la vibración de los enlaces B-O. Dicha banda es muy poco perceptible en el *Solvent Casting* con Boro al 5 %, sin embargo, en las nanofibras, se puede detectar dada la alta presencia de Borax en la membrana electrohilada.

Los picos presentes en torno a 1120 [50] y entre $1300\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ son propios del enlace asimétrico B-O [37]. Estos últimos picos también se detectan con facilidad en las nanofibras dada la alta presencia de bórax en el interior de las nanofibras. La presencia de los picos propios de estos enlaces indica que se ha conseguido albergar bórax en el interior de las nanofibras que componen la membrana electrohilada.

Asimismo, se ha detectado alrededor de 1080 cm^{-1} una señal correspondiente al enlace C-O antisimétrico del ácido láctico. Dicha señal no es clara en las nanofibras porque, probablemente, esté siendo tapada por la emitida por el B-O asimétrico; sin embargo, en los *Solvent Casting* sí que se puede apreciar. Alrededor de 1454 cm^{-1} se encuentra la señal del enlace C-H que tiene unido el carbono del grupo éster, por un lado, y el oxígeno del enlace C-O antisimétrico por el otro [51].

En las proximidades de 1400 cm^{-1} se encuentra la señal del enlace C-O-C del enlace éster; dicho pico se observa en las cuatro curvas con claridad.

Los picos obtenidos en todas las curvas alrededor de 2350 cm^{-1} y en torno a 3700 cm^{-1} , en los *Solvent Casting*, corresponden al CO_2 ambiental ya que el equipo de medición no dispone de un sistema de vacío que aislé las muestras del contacto con la atmósfera [52].

Finalmente alrededor de 3000 cm^{-1} se observa, en todas las curvas, una banda débil característica del enlace -CH de los metilos [37].

- **Ángulo de contacto:**

A continuación, en la figura 40, se han representado los valores promedio del ángulo de contacto entre la gota de agua y los soportes materiales realizados.

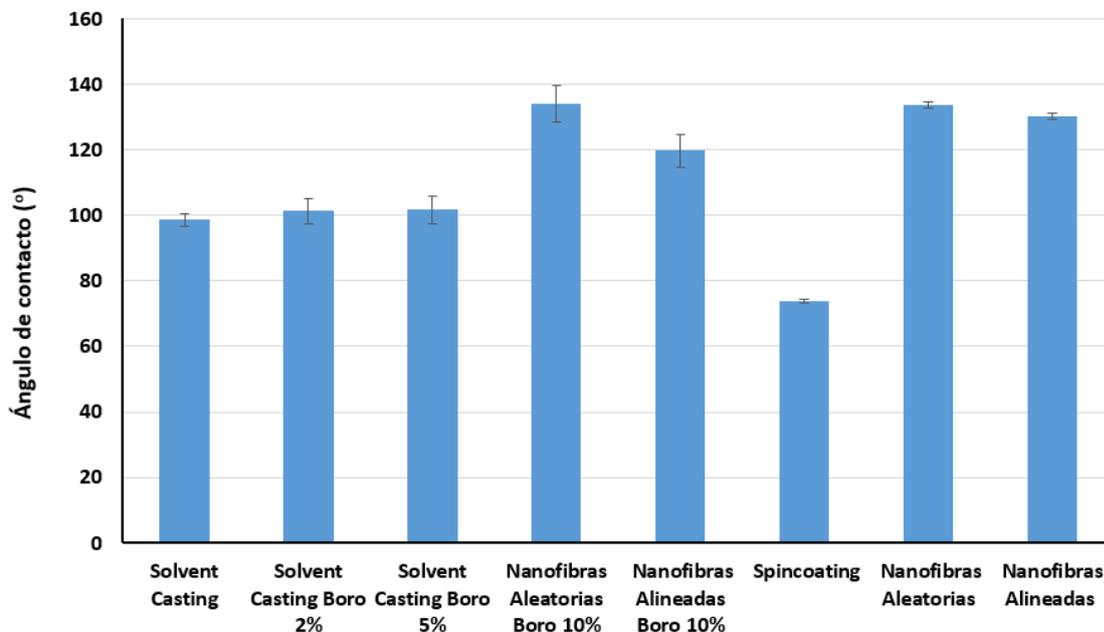


Figura 40. Valores promedio del ángulo de contacto de diferentes sistemas materiales de PLLA.

Como se observa, los valores del ángulo de contacto varían en función de la forma en la que se ha preparado el soporte material de PLLA. El *Spincoating* es el que menor ángulo de contacto tiene, por lo que indica que es el menos hidrófobo de todos los soportes materiales. Los *Solvent Casting* presentan valores muy similares.

Para la obtención de la tensión superficial de los materiales se empleó la ecuación de *Young-Dupre*. Dicha ecuación se presenta a continuación y se deduce a partir de un balance de fuerzas en la zona de contacto de la gota con la superficie sólida donde se deposite (*ecuación 1*) y de la hipótesis de la media armónica (*ecuación 2*) [53]:

$$\sigma_S = \sigma_{SL} + \sigma_L \cdot \cos\theta \quad (1)$$

$$\sigma_{SL} = (\sigma_L^2 - \sigma_S^2)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

Sustituyendo σ_{SL} en la ecuación 1, agrupando términos y despejando σ_S se obtiene la expresión de **Young-Dupre**:

$$\sigma_S = \sigma_L \cdot \frac{(1 + \cos\theta)^2}{4} \quad (3)$$

Siendo:

- σ_L = Tensión superficial del agua, tiene un valor de 0,073 N/m
- σ_S = Tensión superficial del sólido
- σ_{SL} = Tensión superficial de la interfase sólido-liquido
- θ = Ángulo de contacto entre la superficie del sólido de interés y el agua

Con la expresión y los valores de ángulo de contacto medidos, se han obtenido los siguientes valores de tensión superficial para los soportes materiales elaborados (figura 41):

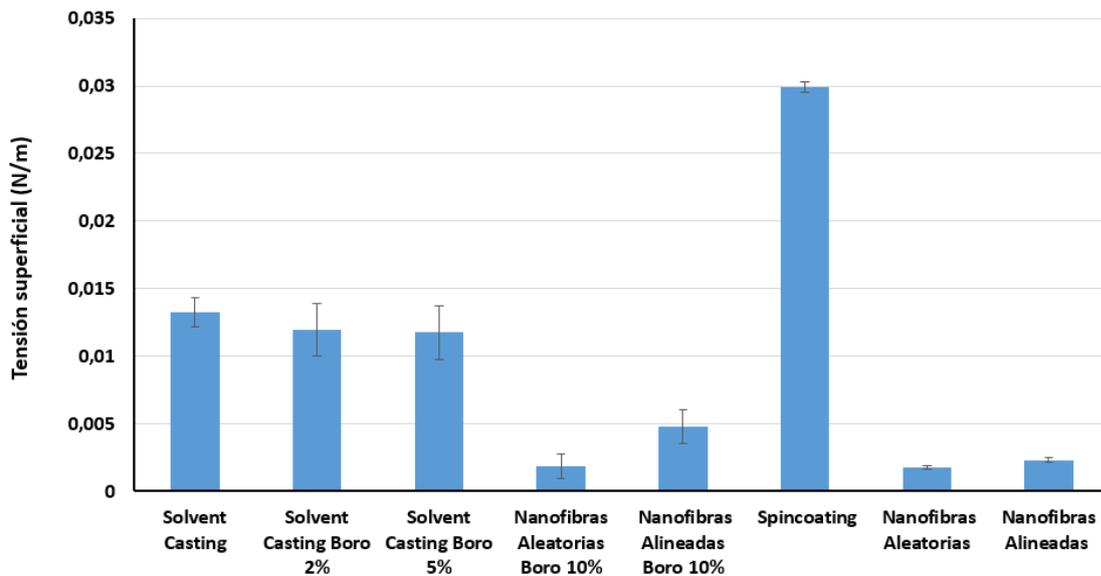


Figura 41. Valores promedio de la tensión superficial de diferentes sistemas materiales el PLLA.

Se observa que el sistema que mayor tensión superficial tiene es el *Spincoater*; esto lo transforma en un soporte con más facilidad para la adhesión biológica (para equilibrar energía libre superficial busca adherirse) [54].

Los *Solvent Casting* presentan valores de la tensión superficial muy similares disminuyendo en promedio al contener Boro. Ello se debe a que los cristales de Borax producen una superficie del material más irregular.

Las nanofibras tienen un valor de tensión superficial especialmente bajo. Se observa que la distribución aleatoria de las nanofibras ha dado lugar a un soporte con tensión superficial más baja que las mismas cuando se encuentran alineadas. Finalmente, el Boro ha producido un descenso de la tensión superficial en las nanofibras rellenas cuando están alineadas.

A continuación se presenta el cuadro resumen de los análisis estadísticos.

Tabla 6. Resumen del ANOVA de la tensión superficial respecto al contenido en Boro y a la técnica empleada

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<i>EFFECTOS PRINCIPALES</i>					
<i>A:Técnica</i>	0,00315033	3	0,00105011	554,69	0,0000
<i>B:Boro</i>	0,0000179431	3	0,00000598104	3,16	0,0347
<i>RESIDUOS</i>	0,0000776194	41	0,00000189316		
<i>TOTAL (CORREGIDO)</i>	0,00387957	47			

De acuerdo al ANOVA ambos factores han contribuido de forma significativa a los valores de tensión superficial obtenidos. Sin embargo, se observa que el factor más influyente es la técnica de fabricación del soporte polimérico.

5.3. Caracterización térmica

- DSC:

A continuación se presentan en la figura 42 los termogramas correspondientes al primer calentamiento de los soportes materiales PLLA. De este primer calentamiento se extrae la información pertinente a la fusión de los cristales.

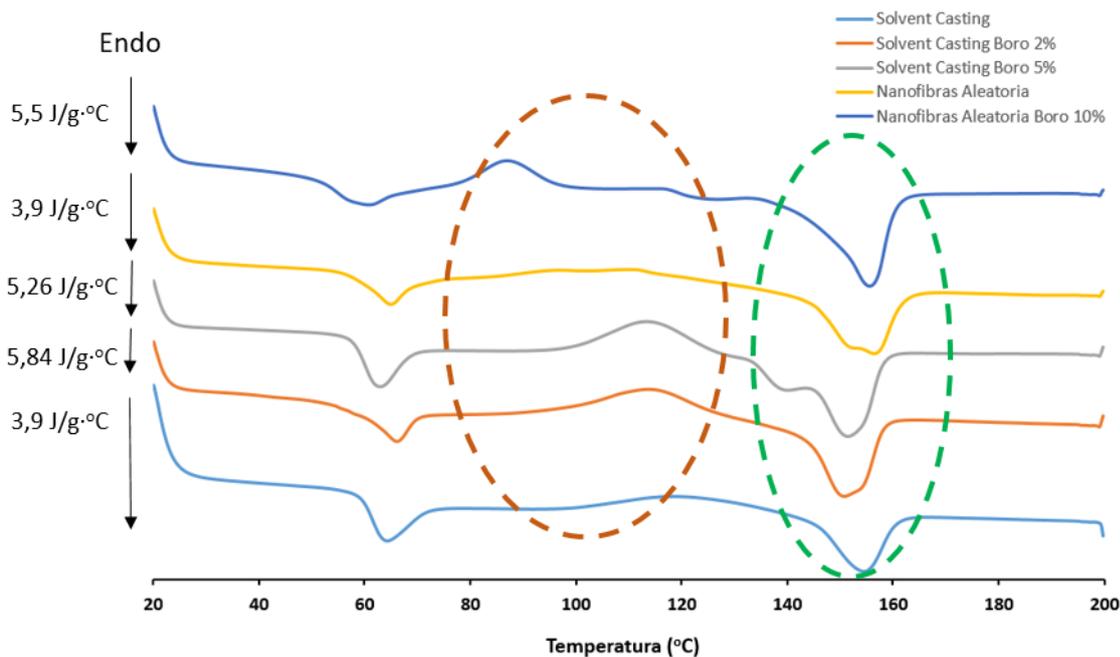


Figura 42. Termograma DSC correspondiente al primer calentamiento de los diferentes sistemas materiales basados en PLLA. La zona marrón discontinúa muestra el intervalo e temperaturas donde puede darse la cristalización fría. La zona verde discontinua representa el intervalo de fusión de los cristales.

En este primer calentamiento se puede extraer la información sobre la parte cristalina. Se observa en las diferentes curvas picos ascendentes en sentido opuesto al flujo calorífico aportado. La presencia de dichos picos es debido a que se está dando un proceso de recristalización fría, que es aquella que se da pasada la temperatura de transición vítrea si no hubiese cristalizado previamente [55].

Como se observa, esos picos aparecen a menores temperaturas y de forma más pronunciada en aquellas curvas con presencia de boro; este hecho podría sugerir que el boro actúa como un agente *nucleante*. Los picos descendentes pertenecientes al tramo de temperaturas superior, corresponden a la zona de fusión de los cristales. En esta zona se observa que la temperatura requerida para fundir los cristales es mayor, también, cuando aumenta el contenido en boro en el sistema.

A continuación se ha calculado la cristalinidad de los sistemas materiales. Ya que la función final de la membrana es la de actuar en condiciones fisiológicas (37°C) no se ha calculado la cristalinidad después de las recristalizaciones frías, sino la inicial que tenían los sistemas materiales. Para ello se ha empleado la siguiente ecuación:

$$\% \text{Cristalinidad} = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \cdot 100 \quad (4)$$

Siendo:

ΔH_m : Entalpía de fusión experimental (J/g)

ΔH_m^0 : Entalpía de fusión teórica del PLLA cuando es 100% cristalino. Tiene un valor de 93 J/g [56]. Dada la baja presencia de boro la variación de la entalpía de fusión teórica se puede asumir constante.

Los datos obtenidos se reflejan en la Tabla 7:

Tabla 7. Grados de cristalinidad y temperaturas de fusión obtenidas para los soportes materiales basados en PLLA

Método	ΔH_m (J/g)	%Cristalinidad	Temperatura de fusión (°C)
Solvent Casting	4,07	4,376	142,88
Solvent Casting con Boro 2 %	7,91	8,50537	141,26
Solvent Casting con Boro 5 %	21,22	22,817	143,37
Nanofibras PLLA	15,10	16,236	143,37
Nanofibras PLLA con Boro al 10 %	18,30	19,677	145,12

En este primer barrido se ha observado la aparición de cristalización fría, sin embargo no se puede afirmar si se han formado nuevos cristales de PLLA en los medios carentes de Boro y si el Boro tiene una influencia importante como agente nucleante. Con el fin de analizar con más detenimiento los cambios estructurales del sistema, se realizó un enfriamiento de los materiales. Los termogramas correspondientes se muestran a continuación en la figura 43.

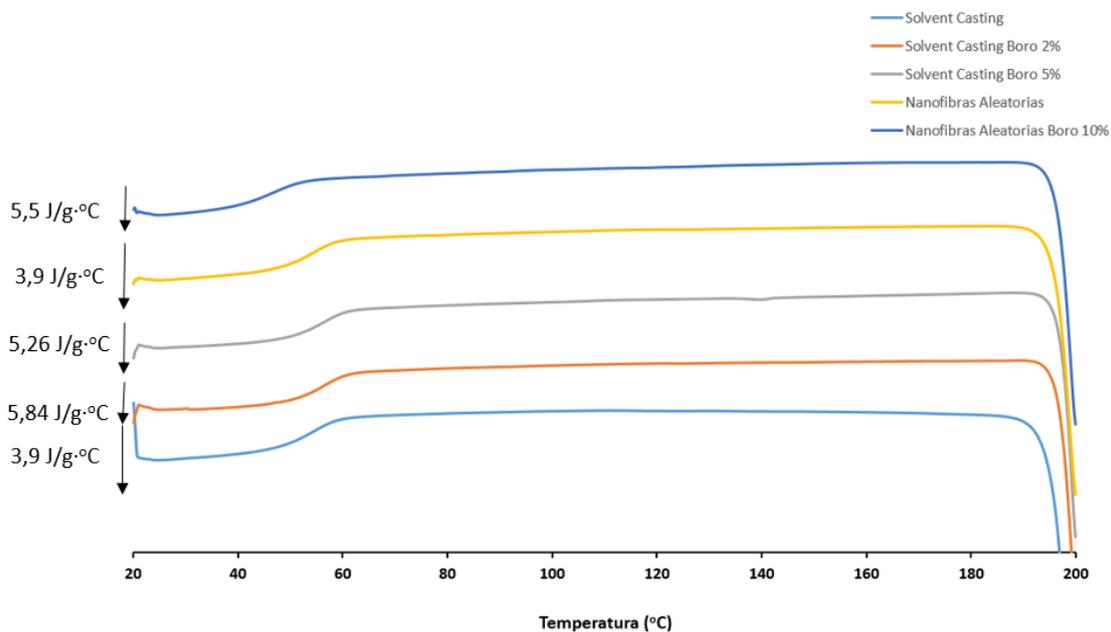


Figura 43. Termograma DSC correspondiente al enfriamiento de los diferentes sistemas materiales basados en PLLA.

En el termograma correspondiente al enfriamiento de los materiales, se observa un ligero descenso de la pendiente del flujo térmico por unidad másica y de tiempo. Dicho descenso, para todas las formas materiales estudiadas, corresponde a las zonas de transición vítrea como se verá a continuación en la figura 44.

La otra información a resaltar es la ausencia de picos intermedios durante todo el rango de enfriamiento desde 200 °C hasta aproximadamente 60 °C (zona aproximada de las transiciones vítreas). Esta uniformidad en el tramo sugiere que no habido apenas formación de núcleos de cristales nuevos durante esta etapa de enfriamiento. El principal motivo de esta falta de cristalización ha sido el elevado ratio de enfriamiento que, termodinámicamente, no permite alcanzar un equilibrio de cristalización. De haber empleado un ratio de enfriamiento más bajo (inferior a 5 °C/min) se hubieran apreciado, en el termograma, picos característicos de la formación de núcleos [57]. El termograma del enfriamiento ha permitido deducir que las recrystalizaciones frías que se visualizan en las curvas de la figura 43 son debidas al crecimiento de cristales previamente generados, ya que la alta temperatura sí favorece un crecimiento de grano [58].

Cómo se comentó en el procedimiento experimental, era necesario realizar un segundo barrido térmico para poder extraer la información de la transición vítrea de los sistemas materiales que se han realizado, sin tener en cuenta el efecto del envejecimiento físico del polímero que se disipó con el primer barrido. El termograma perteneciente a ese segundo barrido es el que se presenta a continuación en la figura 44.

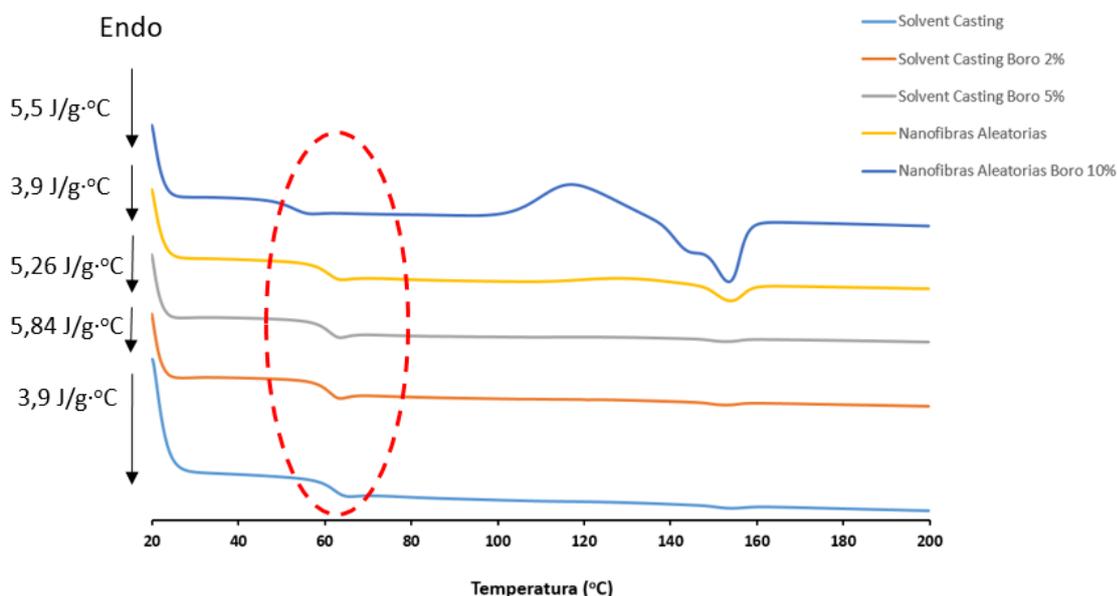


Figura 44. Termograma DSC correspondiente al segundo calentamiento de los diferentes sistemas materiales basados en PLLA. La zona marcada en rojo discontinuo marca las zonas de la transición vítrea del PLLA en cada uno de los soportes materiales.

Como bien se puntualizó en el análisis del termograma de enfriamiento, se puede observar como la transición vítrea de los diferentes soportes materiales está próxima a 61 °C.

En este segundo termograma se observa que aparecen pequeñas bandas en la zona de fusión para los *Solvent Casting*. De la misma forma se observa que en las nanofibras aleatorias se vuelve a producir una cristalización fría, que se manifiesta posteriormente en un pico de fusión más elevado.

Finalmente, se observa que en las nanofibras rellenas de la solución acuosa de Borax se da un pico de recristalización fría muy elevado que posteriormente se vuelve a fundir. Este fenómeno ya se dió en las curvas del primer calentamiento y se ha vuelto a dar para una concentración de Boro en el sistema suficientemente elevada y, por tanto, este segundo barrido ha permitido corroborar que el Boro está actuando como una especie nucleante, ya que el PLLA sólo ha aumentado el crecimiento de los picos de recristalización que ya tenía, por la elevada velocidad de calentamiento y, por tanto, son insuficientes para dar un pico de fusión tan elevado.

A continuación se presenta una tabla resumen (Tabla 7) que recoge los datos experimentales de las temperaturas de transición vítrea. El método gráfico con el que se permite obtener estos datos se explica en los ANEXOS, junto a un termograma del PLLA donde se ve la medición de esta propiedad del PLLA.

Tabla 8. Temperaturas de transición vítrea obtenidas para los soportes materiales basados en PLLA.

Método	Temperatura de transición vítrea (°C)
<i>Solvent Casting</i>	61,02
Solvent Casting con Boro 2 %	59,85
Solvent Casting con Boro 5 %	59,74
Nanofibras PLLA	59,49
Nanofibras PLLA con Boro al 10 %	51,50

En este ensayo no se han podido realizar análisis estadísticos por falta de réplicas suficientes; esto obstaculiza que el ANOVA tenga grados de libertad suficientes para estudiar los factores de interés con una significancia estadística.

- **TGA:**

La curva de pérdida de masa con el avance de la temperatura facilitados por el equipo de medida para los diferentes materiales se muestra a continuación en la figura 45.

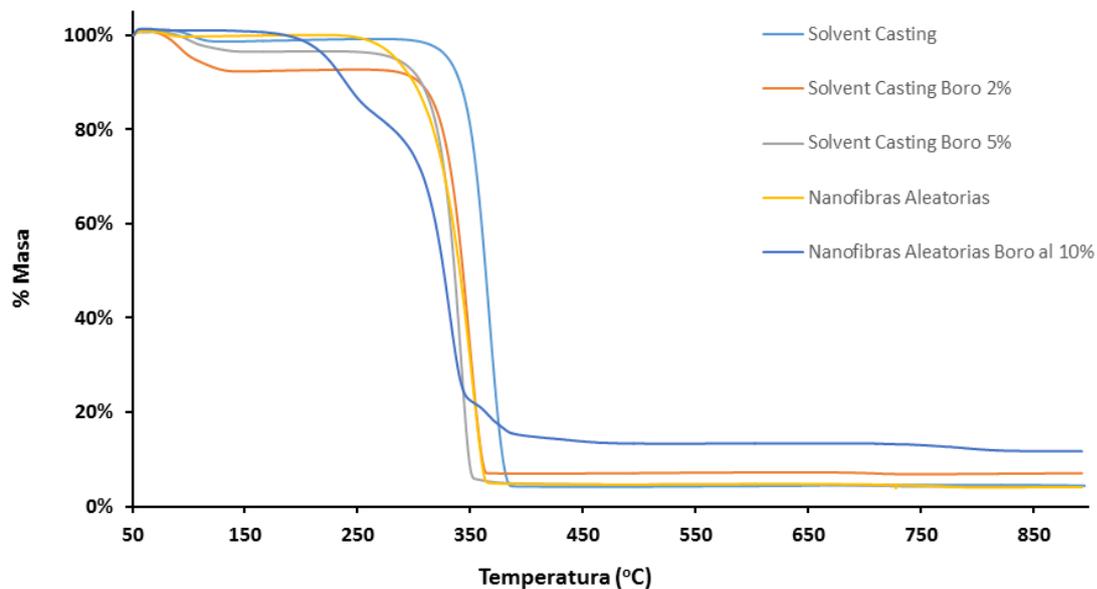


Figura 45. Curva de pérdida de masa durante la termogravimetría de los diferentes sistemas materiales basados en PLLA.

Se observa que el *Solvent Casting* de PLLA tiene una pérdida inicial probablemente de fracciones volátiles del material o de posibles restos de disolvente.

En el caso de los *Solvent Casting* con Boro al 2 % y al 5 % se observa que esas pérdidas iniciales son mayores. En esta ocasión, a la pérdida de posibles especies orgánicas volátiles, se debe tener en cuenta, también, la pérdida del agua que forma parte de la estructura del Borax (Borato sódico decahidratado).

En el caso de las nanofibras sin bórax esa pérdida inicial es casi despreciable. Ello es debido a que prácticamente todo el disolvente se debió evaporar durante el proceso de *electrospinning*. En el caso particular de las nanofibras producidas por *electrospinning* coaxial se observa que la pérdida de agua no se da hasta pasado el punto de ebullición del agua. Ello probablemente sea debido a la alta concentración de borato sódico. Los oxígenos hacen enlaces de hidrógeno con los hidrógenos del agua, reteniendo el agua que hidrata la molécula de Borax y necesitan, por tanto, más temperatura para evaporarla.

Entre 300 y 400 °C se observa un descenso de la mayor parte de la masa de los materiales. Dicho intervalo se corresponde a la degradación del polímero y, finalmente, se observa (en todas las curvas) que se ha alcanzado un porcentaje de masa estacionario equivalente a la presencia de compuestos inorgánicos (a partir de la degradación térmica el ambiente pasa de ser inerte a oxidante).

Representando la derivada de la masa respecto a la temperatura se obtienen las curvas de la figura 46. Dichas curvas permiten detectar la temperatura de degradación de los materiales poliméricos; para ello se registran las variaciones másicas respecto a las variaciones térmicas y el pico, donde mayor variación se haya dado, es en el que se ha producido la degradación térmica del material.

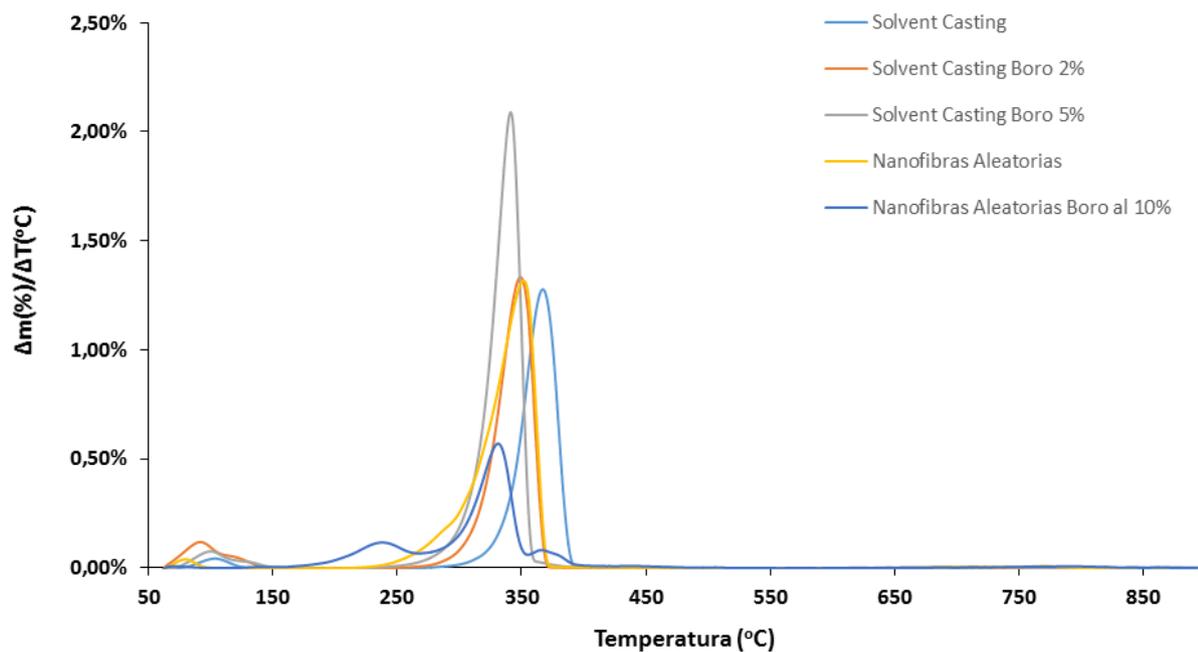


Figura 46. Curva de la derivada de la masa respecto a la temperatura para los diferentes sistemas materiales basados en PLLA.

Se observa que los rangos de temperaturas de degradación son cercanos. El que menor temperatura ha necesitado es el de las nanofibras *Aleatorias* rellenas de la disolución acuosa de Boro. Los *Solvent Casting* y las nanofibras *Aleatorias* se han degradado a temperaturas mayores. En la figura 47 se ha representado la temperatura de degradación de cada material.

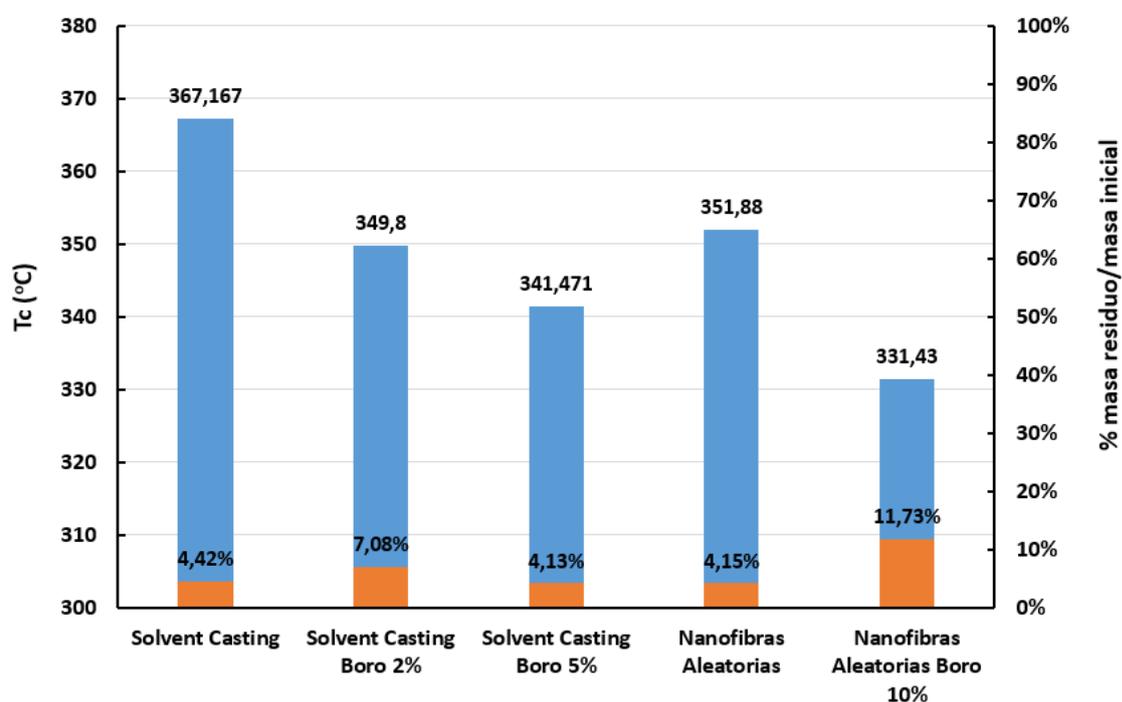


Figura 47. Curva de la derivada de la masa respecto a la temperatura para los diferentes sistemas materiales basados en PLLA.

La temperatura de degradación, en el caso de los *Solvent Casting*, va disminuyendo con el contenido de Boro en el medio, siendo mayor cuando no hay presencia de éste. Ocurre la misma tendencia con las nanofibras. Las nanofibras que no tienen Boro contenido requieren mayor temperatura para degradarse térmicamente.

Igualmente, a lo ocurrido con el *DSC*, no se puede realizar un *ANOVA* por falta de réplicas suficientes que otorguen grados de autonomía suficientes al *ANOVA* para poder estudiar la significancia estadística de los factores que cambian; en este caso, el contenido de Boro y la técnica de producción del material.

5.4. Estudio de la liberación del Boro

La recta da calibrado se muestra en el *ANEXO*. La evolución de la liberación de Boro al medio se muestra a continuación en la figura 48.

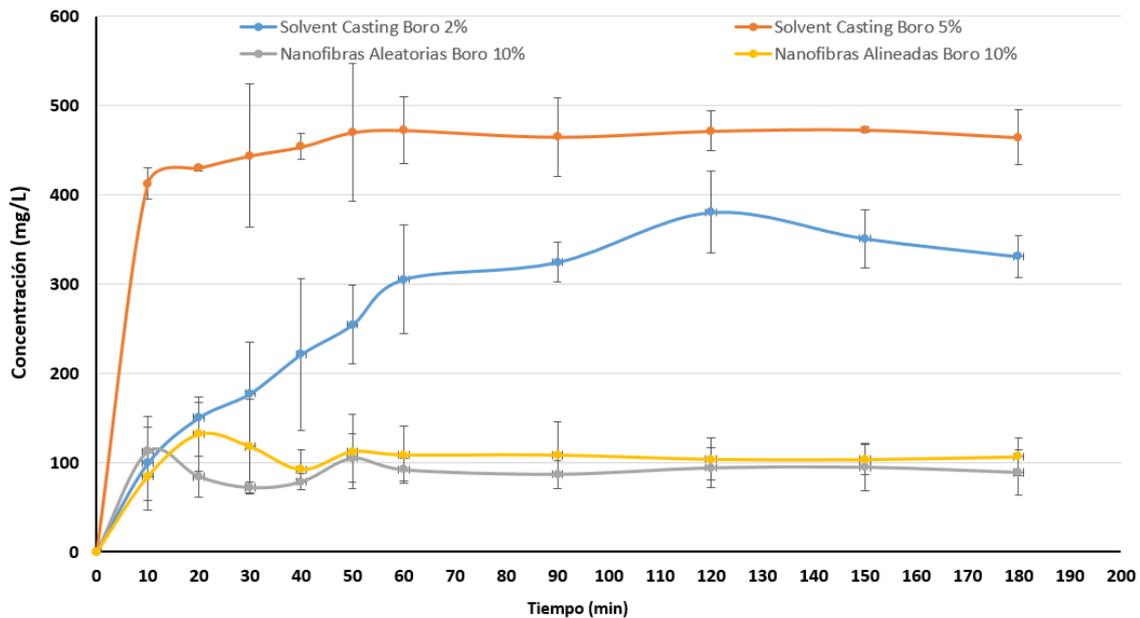


Figura 48. Curva de la liberación del Boro al medio con el tiempo.

Se observa que la liberación de la mayoría de Boro se ha dado en poco tiempo; el *Solvent Casting* con el 5 % de Boro ha liberado más cantidad al medio, seguido del *film* con Boro al 2 %.

Finalmente han liberado menos cantidad las nanofibras. Sin embargo, en este gráfico se ha tenido en cuenta la superficie de material, no la cantidad de material. De este gráfico se puede concluir que se ha conseguido que las nanofibras estén rellenas porque se ha visto que liberan Boro al medio. No se ha podido estudiar si el sistema ha seguido liberando a tiempos prolongados por problemas con la azometina; no obstante, los últimos valores representados sugieren que se ha liberado prácticamente todo el Boro al medio durante las 3 primeras horas.

A continuación se presenta una tabla recopilatoria (de las masas de las réplicas empleadas para la liberación (Tabla 9):

Tabla 9. Masas de los soportes materiales empleados en el estudio de liberación controlada

Método	Masa de material (mg)
Solvent Casting con Boro 2 %	12,24
	11,93
	12,80
Solvent Casting con Boro 5 %	13,64
	14,30
	13,61
Nanofibras PLLA Aleatorias con Boro al 10 %	1,02
	1,10
	1,038
Nanofibras PLLA Alineadas con Boro al 10 %	1,02
	1,00
	1,23

Con dichos valores a continuación se representa la cantidad total liberada por unidad másica del material para poder comparar todos los sistemas (figura 49).

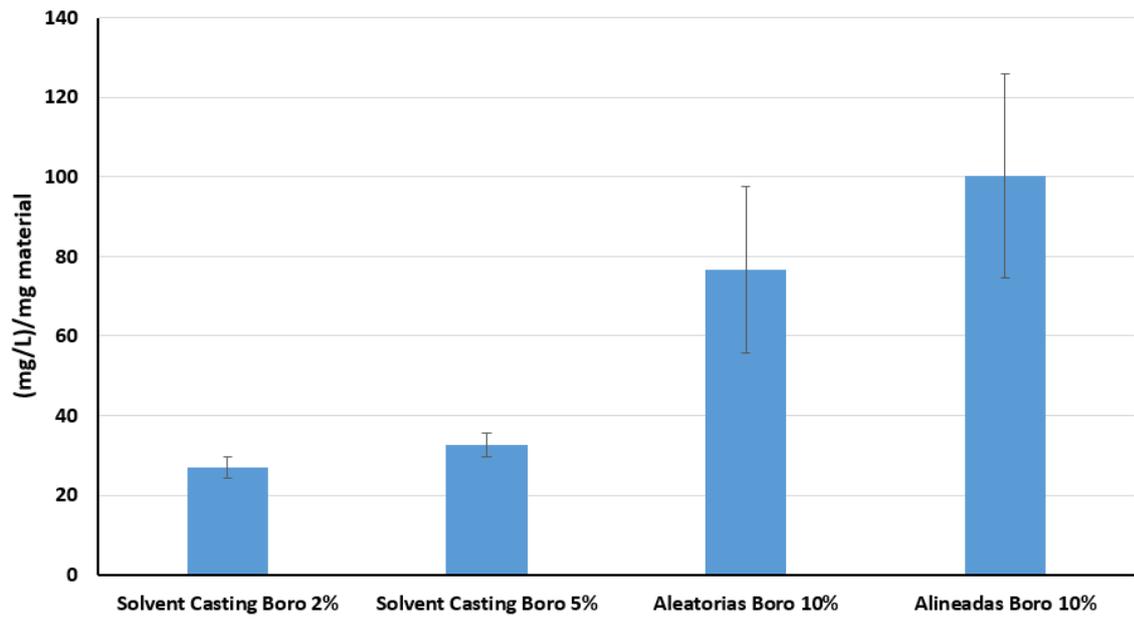


Figura 49. Liberación por unidad de masa de los diferentes sistemas materiales

Al representarlo de esta manera, se observa como se ha conseguido una membrana que, de tener la misma cantidad másica, hubiera liberado una cantidad muy superior de Boro al medio que los *Solvent Casting*.

Finalmente el análisis estadístico se muestra a continuación (Tabla 10):

Tabla 10. Resumen del ANOVA de la influencia de la técnica en la liberación de Boro por unidad de masa de material

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11203,80	3	3734,59	9,02	0,0060
Intra grupos	3312,42	8	414,052		
Total (Corr.)	14516,20	11			

No se ha podido estudiar la influencia del Boro al no tener niveles intermedios con los que el programa pueda comparar; el *electrospinning* se ha hecho con una concentración de Boro del 10 %. Por tanto, como se ve en el ANEXO, se ha tenido que introducir *Solvent Casting Boro 2 %*, *Solvent Casting Boro 5 %*, *Aleatorias B10 %* y *Alineadas B10 %* como técnicas independientes para que lo analizara. Y dicho factor ha salido muy significativo.

En la liberación por unidad de masa, el *electrospinning* coaxial ha demostrado tener capacidad para albergar más cantidad de especies bioactivas por unidad másica de material.

5.4. Estudio de la degradación de los soportes materiales

Se evaluó la pérdida másica del PLLA cuando se presentaba de diferentes formas.

La pérdida de masa se cuantifica como:

$$\% \text{pérdida masa} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100 \quad (5)$$

Siendo:

m_0 la masa inicial de la muestra

m_t la masa de la muestra en el instante t.

Para las diferentes muestras se calculó el porcentaje de pérdida de masa. La evolución de dichas pérdidas en el tiempo se muestra a continuación en la figura 50.

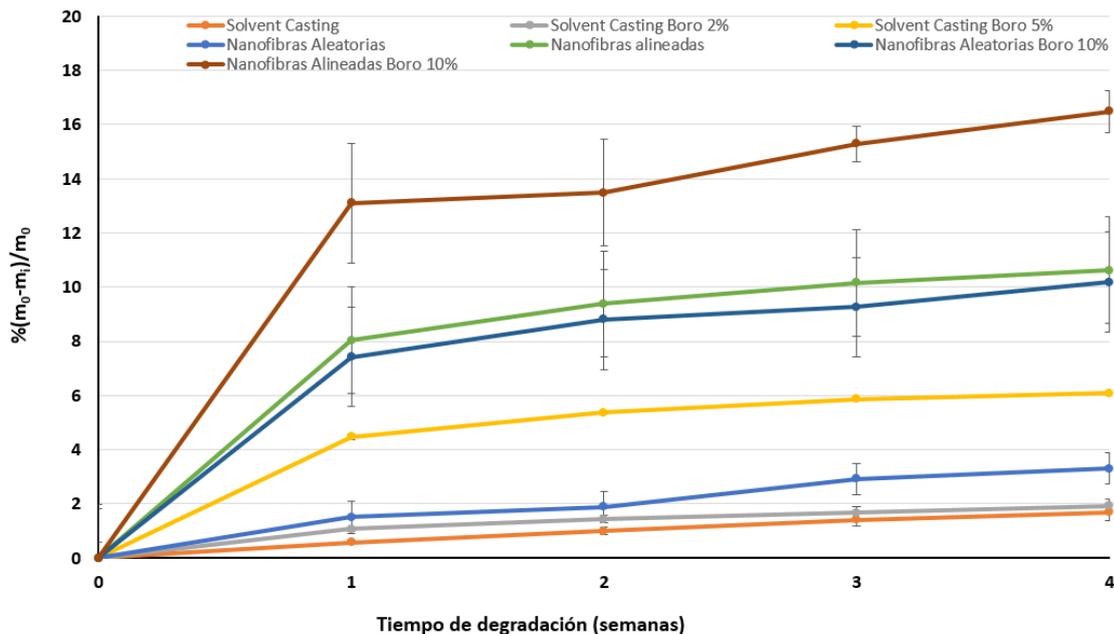


Figura 50. Curva de la derivada de la masa respecto a la temperatura para los diferentes sistemas materiales basados en PLLA.

El PLLA presenta una velocidad de degradación muy lenta. En este estudio se ha visto que el *Solvent Casting* es el que menor pérdida de masa ha tenido. El PLLA sufre un proceso de degradación autocatalítica en que se produce la rotura aleatoria de los enlaces ésteres y se ve más favorecido en *films* que en *scaffolds* porosos [59]. El agua penetra en la red polimérica produce la degradación del ácido poliláctico en tres etapas.

Dada la duración del ensayo y las pérdidas registradas se puede deducir que el PLLA del *Solvent Casting* se encuentra en la primera. Ésta se caracteriza por una pérdida del peso molecular del polímero, pero teniendo todavía macromoléculas que son insolubles en agua, por lo que la variación másica del PLLA es casi inexistente [60]. Se observa como al aumentar el contenido de boro en un *Solvent Casting* de PLLA el aumento de la pérdida de masa es superior (la pérdida correspondiente al paso del momento 0 a la semana 1 se debe por la liberación del boro en el medio). A partir de ese punto las pendientes son exactamente las mismas (en torno a, ello es señal de que el PLLA se degrada de forma hidrolítica y no se ve acelerado el proceso por la presencia de boro).

Las nanofibras aleatorias de PLLA no experimentan ese salto inicial al no contener Boro, sin embargo en el transcurso del tiempo se observa una pérdida de peso superior a la que experimenta cuando se encuentra en forma de *film*. Ese aumento en la pérdida de peso es debida a causa de su estructura nanoporosa.

Ello ofrece una elevadísima área superficial que interacciona con el agua y tiene menos dificultad para difundir entre las cadenas del ácido poliláctico. En el caso de las nanofibras alineadas se ha observado un descenso de la masa bastante superior a la pérdida de las nanofirbas aleatorias.

Este descenso probablemente sea debido a que, al no estar unidas por los puntos de anclaje que cabría esperar en una membrana de nanofibras aleatorias, la acción conjunta de la degradación y de la hidrofobicidad de las nanofibras hayan provocado separación y disgregación de algunas de éstas en el medio.

Se observa una pérdida de masa final en las nanofibras aleatorias con Boro similar a las nanfibras de PLLA alineadas. En esta ocasión a pesar de aportar los puntos de anclaje hay que tener en cuenta que, por la liberación de la disolución acuosa de boro internada en ellas, se ha permitido la entrada del agua al interior de éstas, de forma que ofrecen todavía un área específica aún mayor al entrar en contacto el PLLA con el agua por dentro y por fuera de la nanofibra.

Finalmente la pérdida de masa más significativa que se ha observado es la que se ha dado en las nanofibras alineadas con Boro contenido. En ellas se han dado simultáneamente dos efectos; por un lado aumenta el área específica al permitir al agua entrar por donde se ha evacuado la disolución acuosa de Boro, por el otro lado la falta de puntos de anclaje y su carácter hidrófobo ha permitido la separación aislada de fibras y su posterior degradación.

El ANOVA realizado muestra los siguientes resultados (Tabla 11):

Tabla 11. Resumen del ANOVA realizado sobre la pérdida de peso.

Análisis de Varianza para %Pérdida final de masa - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Técnica	194,271	2	97,1357	6,59	0,0089
B:%Boro	158,34	3	52,7801	3,58	0,0393
RESIDUOS	221,24	15	14,7494		
TOTAL (CORREGIDO)	763,868	20			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

El ANOVA confirma que existe una diferencia estadísticamente significativa para el PLLA cuando está en forma de *Solvent Casting* o en forma de nanofibra y cuando tiene Boro de cuando no.

Con el fin de poder analizar el efecto que ha tenido la degradación hidrolítica en las nanofibras rellenas se ha procedido a realizar capturas FESEM de dichas membranas pasado el mes de estudio de degradación. A continuación se presenta la captura a 200 aumentos (figura 51).

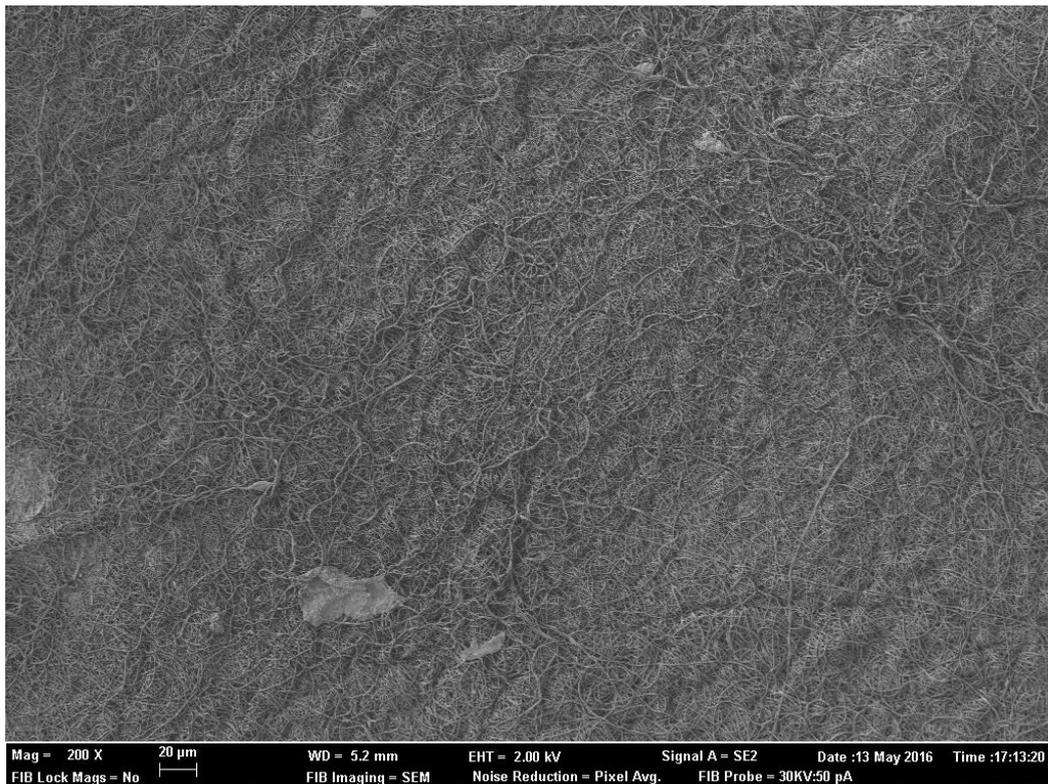


Figura 51. Fotografía FESEM de las nanofibras coaxiales *Aleatorias* a 200 aumentos pasado un mes de degradación hidrolítica

En la figura 51 se observa que las nanofibras han modificado su disposición. Este fenómeno, probablemente, ha sido debido a su hidrofobicidad. El contacto con el agua ha producido la degradación de los puntos de contacto, de forma que, las nanofibras para minimizar las fuerzas de repulsión se desplazan de sus posiciones, torsionándose y adquiriendo posiciones que les proporcione mayor estabilidad. Para analizar de forma más precisa la influencia en la estructura se han realizado capturas *FESEM* a más aumentos (figuras 52,53 y 54).

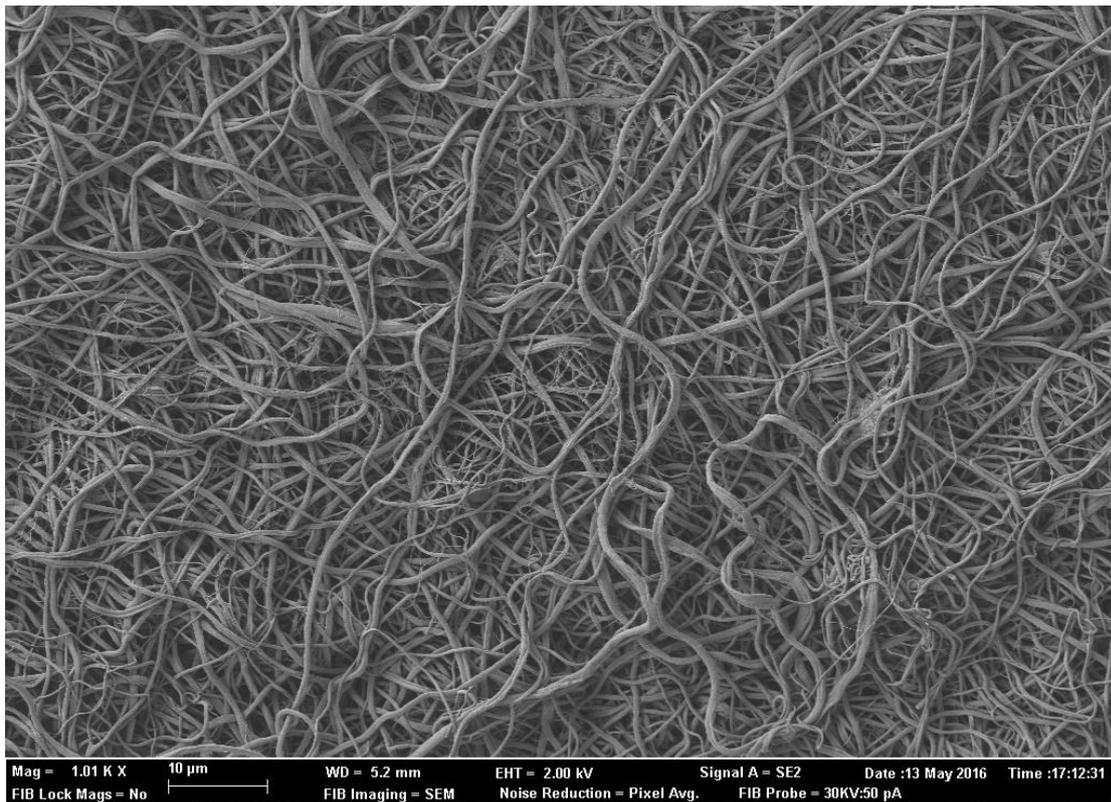


Figura 52. Fotografía *FESEM* de las nanofibras coaxiales *Aleatorias* a 1010 aumentos pasado un mes de degradación hidrolítica

Se observa de forma más precisa lo referido en la anterior fotografía. El contacto del agua con las nanofibras de PLLA ha hecho que la red tridimensional adquiera una estructura desordenada. Se observa que hay nanofibras más finas que otras ya que, probablemente han perdido algo de diámetro a causa de la degradación hidrolítica.

A estos aumentos no se permite distinguir la rotura de las nanofibras a causa de la entrada de agua por la zona de escape de la solución acuosa de Borax. Para poder analizar si se ha dado ese fenómeno se han realizado capturas a más aumentos (figura 53).

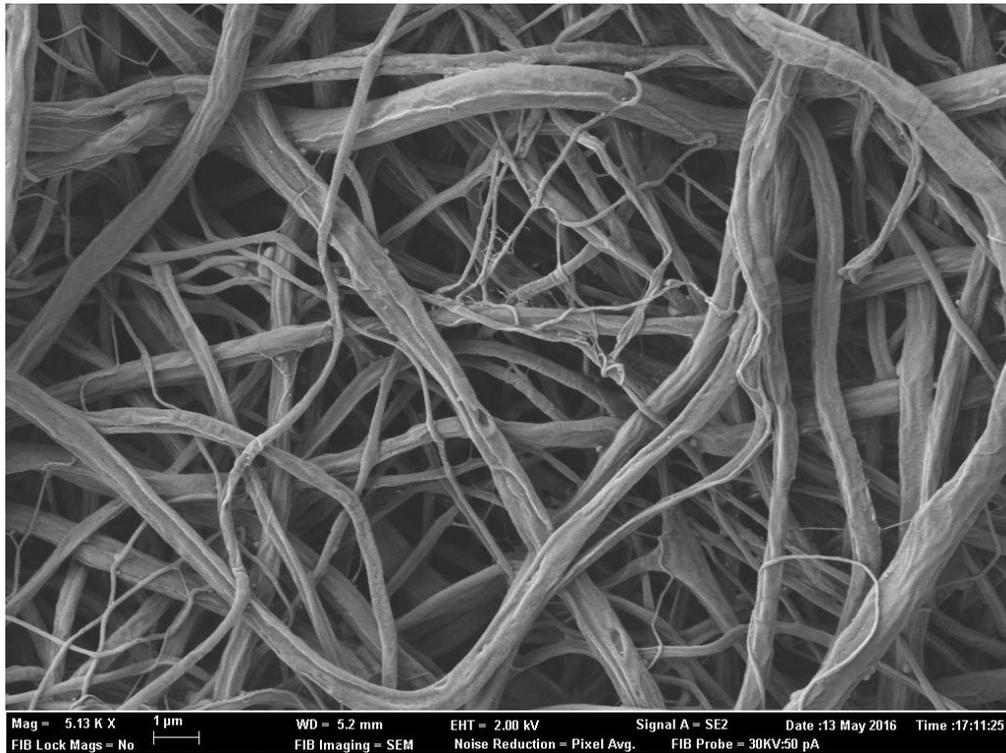


Figura 53. Fotografía FESEM de las nanofibras coaxiales *Aleatorias* a 5130 aumentos pasado un mes de degradación hidrolítica

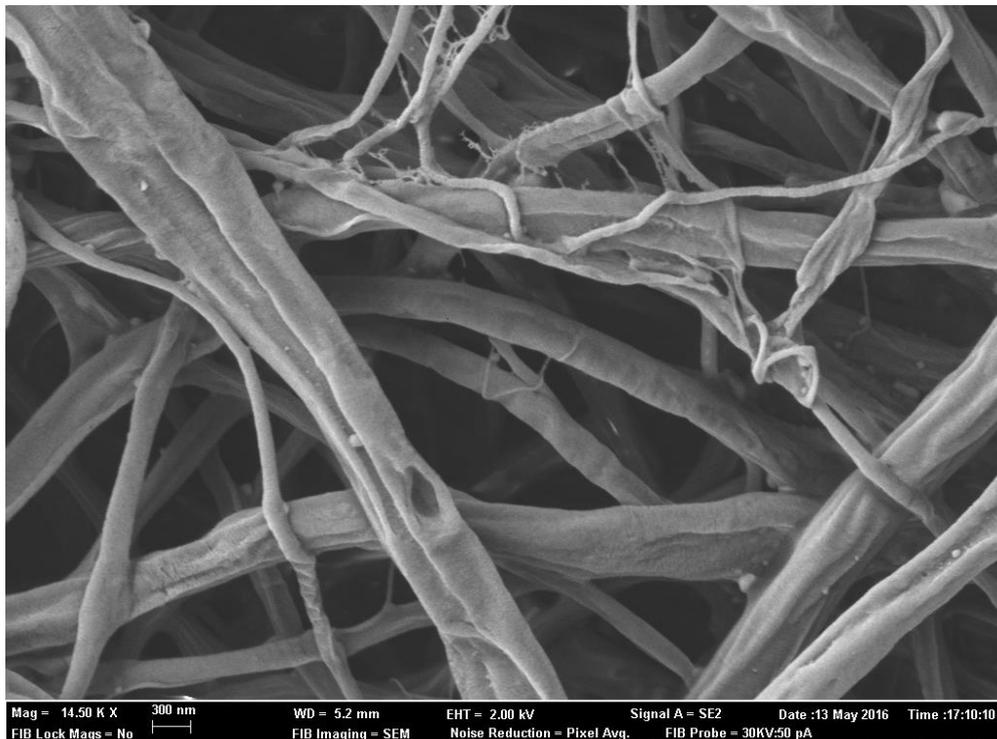


Figura 54. Fotografía FESEM de las nanofibras coaxiales *Aleatorias* a 14500 aumentos pasado un mes de degradación hidrolítica

Se observa lo mencionado anteriormente. La nanofibra parece haber colapsado por el vaciado del medio acuoso interno, que le hace parecer aplastada aunque no se debe descartar que haya sido por el vacío aplicado a las muestras para su visualización en el FESEM.

Se observa también con más claridad la presencia de orificios en la superficie de la nanofibra. Esto permite deducir que se ha dado la degradación hidrolítica, simultáneamente, por el exterior y por el interior de la nanofibra.

Se ha estudiado la degradación y los efectos sobre la estructura de la membrana electrohilada con las nanofibras orientadas aleatoriamente en el espacio. De forma análoga se han realizado capturas *FESEM* para estudiar las consecuencias, en la estructura de la membrana electrohilada, cuando las nanofibras se encuentran orientadas en una dirección.

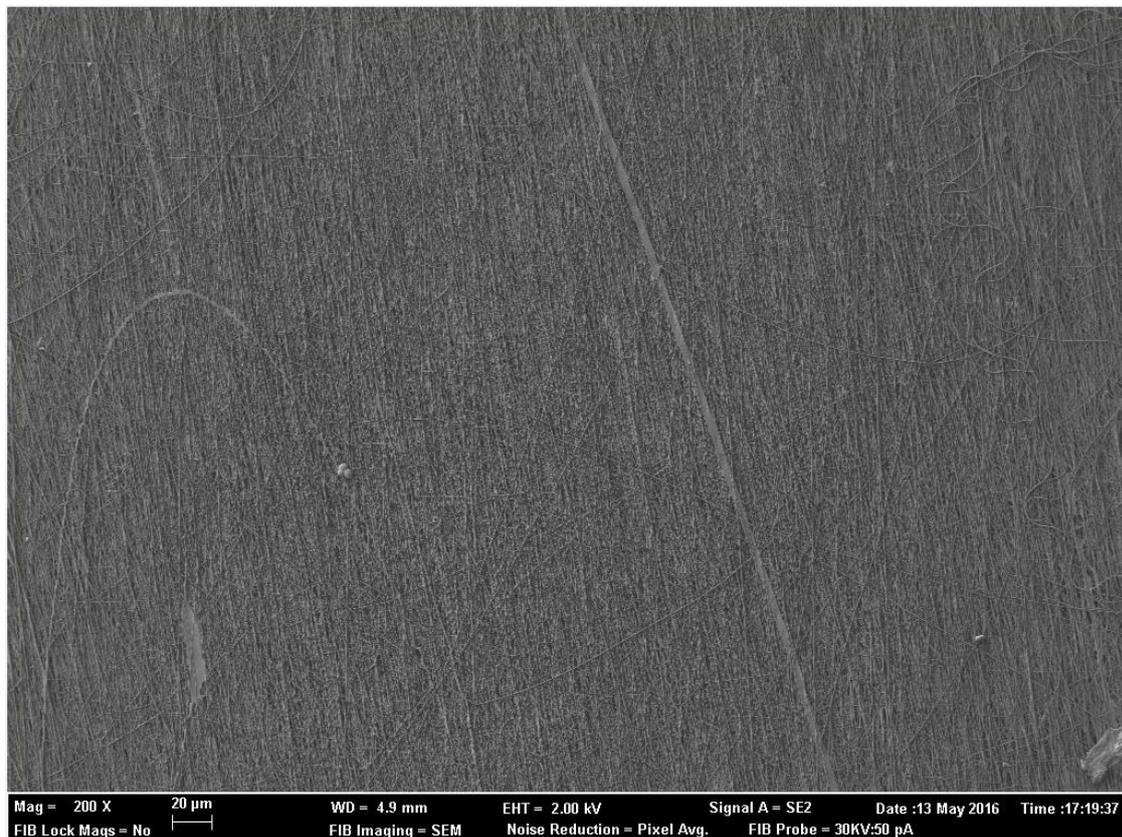


Figura 55. Fotografía *FESEM* de las nanofibras coaxiales alineadas a 1010 aumentos pasado un mes de degradación hidrolítica

Se observa en la fotografía que el efecto de la degradación y la hidrofobicidad no ha desordenado la estructura de una forma tan notoria como con las nanofibras aleatorias pero, ha separado algunas entre sí; este fenómeno ha hecho que algunas de las fibras pierdan la orientación preferencial. Como en esta fotografía no se puede distinguir de qué forma ha afectado la degradación a las nanofibras se han realizado capturas a resoluciones mayores.

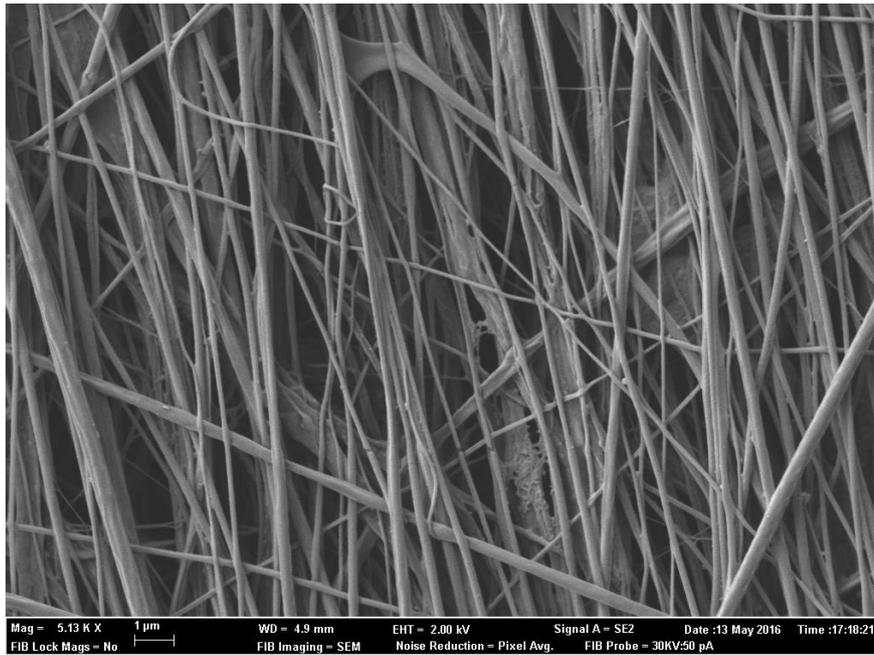


Figura 56. Fotografía FESEM de las nanofibras coaxiales alineadas a 5130 aumentos pasado un mes de degradación hidrolítica.

En esta fotografía se puede observar la degradación de las fibras. En las capas más escondidas se puede observar aglomeraciones de fibras, dando lugar a entramados de diámetros más elevados y que se deshilachan en fibras más pequeñas. Asimismo, no se pueden percibir los agujeros a lo largo de la nanofibra. Ello puede ser debido a que al tener una orientación preferencial, los orificios de escape de la solución acuosa se hallen en los extremos. Sin embargo, la separación entre fibras es un indicador del efecto disgregante que se comentó que el agua podía haber tenido.

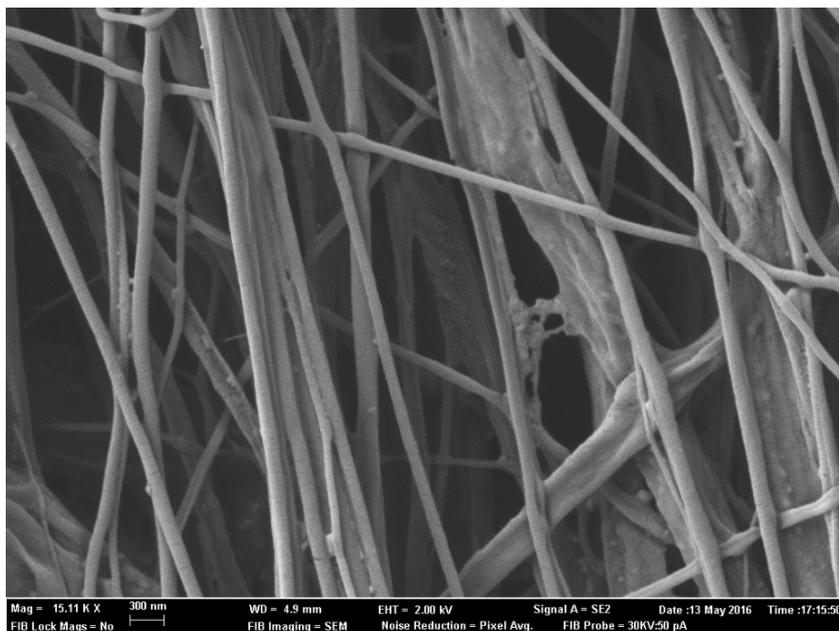


Figura 57. Fotografía FESEM de las nanofibras coaxiales alineadas a 15110 aumentos pasado un mes de degradación hidrolítica.

En esta fotografía se observa claramente el efecto de la degradación en las nanofibras. Se puede apreciar también como por efecto del proceso del electrospinning y del tratamiento térmico se ha producido el pegado de varias nanofibras, dando lugar a una aglomeración de éstas. Se observa también, en los extremos laterales de esa la nanofibra deshecha, una franja característica que sugiere que el agua penetró en el interior de la fibra y desde dentro también contribuyó a su degradación.

6. Conclusiones

Se ha conseguido desarrollar una metodología para la elaboración de un tipo de membrana electrohilada que presenta importantes ventajas, ya que permite fabricar un sistema material que carga internamente las especies bioactivas de interés. Dicha metodología, también, ha permitido elaborar las membranas electrohiladas con dos configuraciones diferentes.

La caracterización microscópica ha confirmado que las nanofibras obtenidas son más grandes que las obtenidas con *electrospinning* simple y la microscopía electrónica ha permitido asegurar que se han conseguido las orientaciones buscadas y que, visualmente, hemos conseguido hacer nanofibras capaces de albergar un medio bioactivo.

La caracterización fisicoquímica ha confirmado que los sistemas materiales desarrollados son contenedores de iones bioactivos, en este caso el bórax. En el caso particular de las membranas electrohiladas, ha permitido confirmar que se ha conseguido introducir la solución de bórax en el interior de las fibras. De los sistemas desarrollados en este trabajo, se ha comprobado que son precisamente las nanofibras las que presentan una hidrofobicidad mayor, viéndose modificada por la presencia de la disolución de Borax respecto a las que carecen de relleno. Este hecho, añadido a la elevada área superficial que es capaz de aportar, lo vuelve un medio muy viable para la adhesión celular.

La presencia de Boro ha demostrado tener un efecto en sus propiedades térmicas como agente nucleante que favorece el crecimiento de los cristales a temperaturas elevadas. Sin embargo respecto al entorno fisiológico (37 °C) la presencia de Boro no ha afectado de una forma significativa a la cristalinidad del material aunque bien permite que los sistemas fabricados (tanto nanofibras como *Solvent Casting*) se degraden térmicamente antes.

El ensayo de liberación ha permitido confirmar que se ha conseguido desarrollar un método de elaborar soportes materiales que representan una importante ventaja al ofrecer altos valores de especie bioactiva liberada en casi la décima parte de material.

Finalmente el *electrospinning* al ofrecer un mallado tridimensional con mayor área específica de contacto que los *Solvent Casting* se ha conseguido aumentar la velocidad de degradación de PLLA. En el caso particular de las nanofibras rellenas incluso aún más por permitir la degradación también desde el interior de la nanofibra.

Como conclusión final; se ha conseguido elaborar una membrana electrohilada novedosa que ha cumplido con las expectativas de optimizar un medio de liberación y que representa una buena alternativa para conseguir una degradación del PLLA más rápida. Aún no se ha podido probar su viabilidad biológica ni analizar la influencia de la orientación de las nanofibras en el desarrollo de los mioblastos, quedando esa labor pendiente a realizar a raíz de las conclusiones de este proyecto.

7. Anexos

Protocolo de preparación de las disoluciones auxiliares para el ensayo de liberación controlada:

- Preparación del Buffer de pH 5,52 de acetato potásico

Se deben pesar 0,1963 gramos de Acetato potásico (>99,5%, Sigma-Aldrich) y añadir 0,832 mL de Ácido Acético Glacial (>99,8%, Scharlab) y aforar con Agua miliQ hasta 10 mL. Si el pH no ha alcanzado 5,52 añadir gota a gota hasta que se consiga.

- Preparación de la disolución de azometina para el ensayo de liberación controlada

Se deben de pesar 90 mg de azometina (Sigma-Aldrich) y a continuación se deben añadir 0,2 g de ácido L-ascórbico (Scharlab). Finalmente aforar con Agua miliQ hasta 10 mL

Tabla promedio datos ángulo de contacto

Técnica	Ángulo de contacto (°)										Promedio	Desviación Típica
	74,45	75,05	74,20	73,55	73,60	73,30	73,60	73,30	73,60	73,30		
Spincoating	74,45	75,05	74,20	73,55	73,60	73,30	73,60	73,30	73,60	73,30	73,692	0,488
Solvent casting	97,90	97,70	96,30	102,30	97,20	99,90	97,20	99,90	97,20	99,90	98,550	1,996
Solvent casting B2%	94,85	103,40	105,25	101,00	98,10	104,85	101,45	110,75	101,242	104,85	101,242	3,753
Solvent casting B5%	100,70	100,85	97,55	98,40	101,45	110,75	101,45	110,75	101,617	110,75	101,617	4,316
Nanofibras Random	133,10	132,50	134,10	134,95	134,15	133,05	134,15	133,05	133,642	133,05	133,642	0,829
Nanofibras Alineadas	129,05	130,70	130,00	131,70	130,10	129,30	130,10	129,30	130,142	130,10	130,142	0,881
Nanofibras Random B10%	136,25	137,60	132,30	122,75	139,95	134,90	139,95	134,90	133,958	134,90	133,958	5,533
Nanofibras Alineadas B10%	113,55	118,25	128,90	116,10	121,30	119,85	121,30	119,85	119,658	119,85	119,658	4,832

Tabla promedio datos tensión superficial

Técnica	Tensión superficial (N/m)										Promedio	Desviación Típica
	2,93E-02	3,04E-02	2,95E-02	3,00E-02	3,00E-02	3,02E-02	3,00E-02	3,02E-02	3,00E-02	3,02E-02		
Spincoating	2,93E-02	3,04E-02	2,95E-02	3,00E-02	3,00E-02	3,02E-02	3,00E-02	3,02E-02	3,00E-02	3,02E-02	2,99E-02	3,82E-04
Solvent casting	1,36E-02	1,37E-02	1,45E-02	1,13E-02	1,40E-02	1,25E-02	1,40E-02	1,25E-02	1,33E-02	1,25E-02	1,33E-02	1,05E-03
Solvent casting B2%	1,53E-02	1,08E-02	9,91E-02	1,20E-02	1,35E-02	1,01E-02	1,35E-02	1,01E-02	1,19E-02	1,01E-02	1,19E-02	1,94E-03
Solvent casting B5%	1,21E-02	1,20E-02	1,38E-02	1,33E-02	1,17E-02	7,61E-03	1,17E-02	7,61E-03	1,18E-02	7,61E-03	1,18E-02	1,99E-03
Nanofibras Random	1,83E-03	1,92E-03	1,69E-03	1,57E-03	1,68E-03	1,84E-03	1,68E-03	1,84E-03	1,76E-03	1,84E-03	1,76E-03	1,18E-04
Nanofibras Alineadas	2,50E-03	2,21E-03	2,33E-03	2,05E-03	2,31E-03	2,45E-03	2,31E-03	2,45E-03	2,31E-03	2,45E-03	2,31E-03	1,51E-04
Nanofibras Random B10%	1,41E-03	1,25E-03	1,95E-03	3,85E-03	1,00E-03	1,58E-03	1,00E-03	1,58E-03	1,84E-03	1,58E-03	1,84E-03	9,44E-04
Nanofibras Alineadas B10%	6,58E-03	5,06E-03	2,53E-03	5,72E-03	4,21E-03	4,62E-03	4,21E-03	4,62E-03	4,79E-03	4,62E-03	4,79E-03	1,27E-03

Tabla 11. Valores medidos de las tensiones superficiales

Spincoater	Solvent Casting	Solvent Casting Boro 5%	Solvent Casting Boro 5%	Solvent Casting Boro 5%	Nanofibras PLLA Random	Nanofibras PLLA Alineadas	Nanofibras Random Boro 10%	Nanofibras PLLA Alineadas Boro 10%
0,02934646	0,01357828	0,015296275	0,012102843	0,011831425	0,00249846	0,001406883	0,00657989	
0,03044225	0,01368719	0,010772356	0,01203281	0,001920661	0,00220894	0,00124855	0,00506254	
0,02954125	0,01446452	0,009913261	0,013769415	0,0016876	0,00232871	0,00195169	0,0025262	
0,03004949	0,01130261	0,011958868	0,01330841	0,001573006	0,00204533	0,00384601	0,0057245	
0,03001042	0,0139681	0,013469486	0,011723609	0,001680624	0,00231151	0,00100372	0,00421345	
0,03024567	0,0125156	0,010094191	0,007611747	0,001838145	0,00245302	0,00157884	0,00461739	

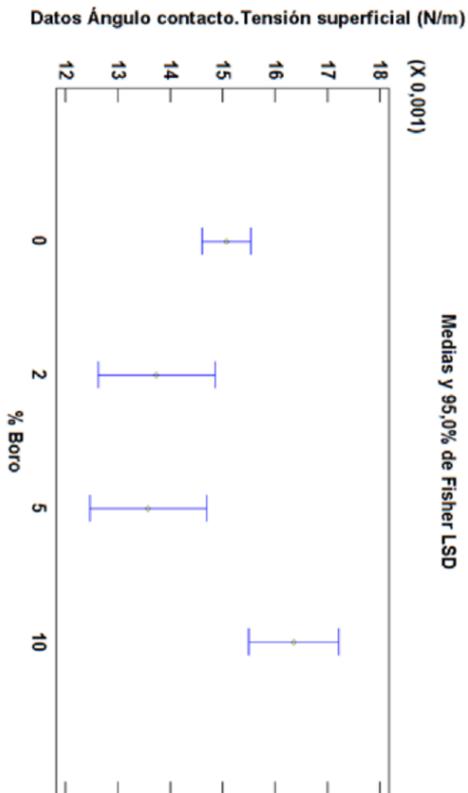
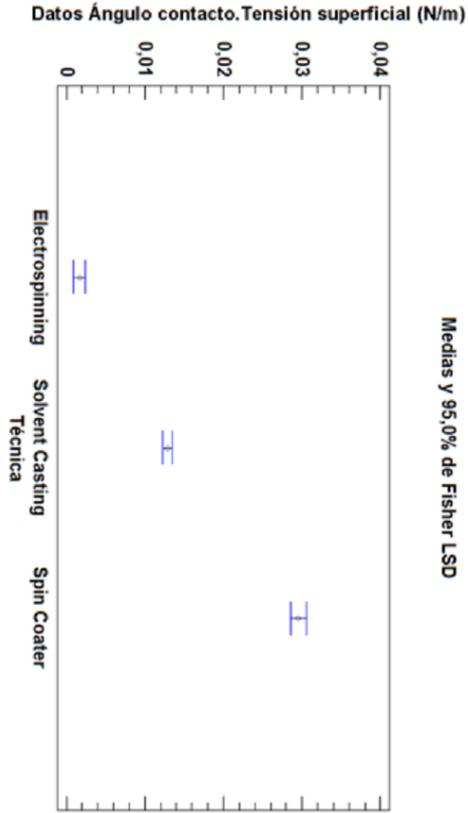


Figura 58. Gráfico de medias LSD para un intervalo de confianza del 95% para los factores que influyen en la tensión superficial.

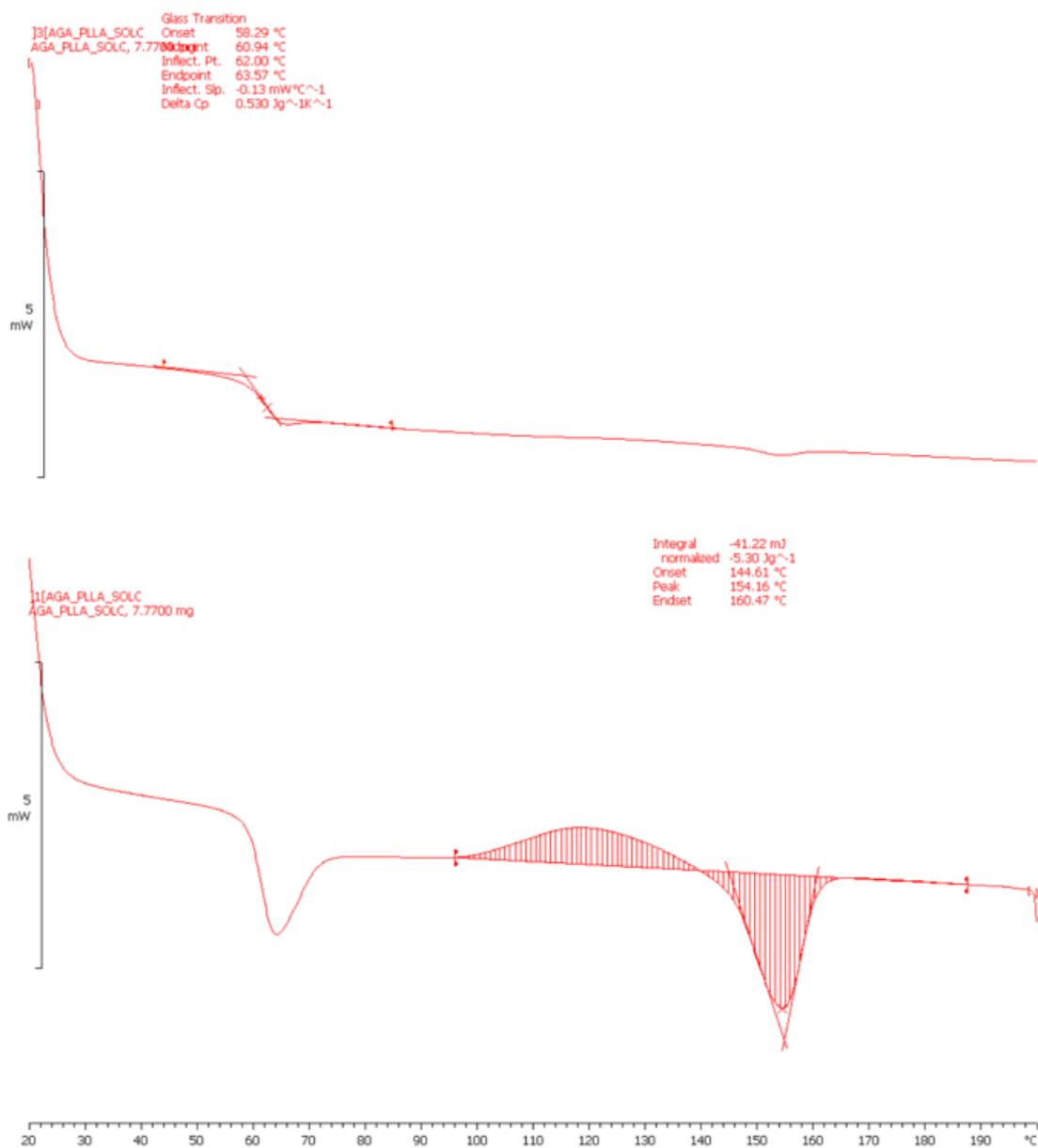


Figura 59. Termograma ejemplo para el cálculo de la temperatura de transición vítrea (curva de arriba) y de la entalpía y temperatura de fusión (curva de abajo).

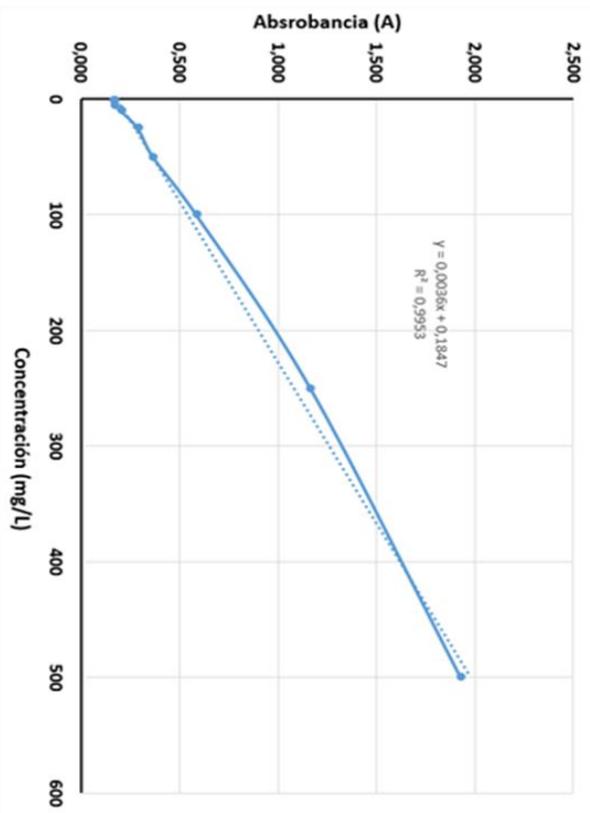


Figura 60. Termograma ejemplo para el cálculo de la temperatura de transición vítrea (curva de arriba) y de la entalpía y temperatura de fusión (curva de abajo).

Tabla 12. Valores medidos de concentración medida a diferentes tiempos.

	Tiempo (min)	10	20	30	40	50	60	90	120	150	180
Solvent	Promedio	99,280	150,227	177,320	221,238	254,555	305,257	324,380	380,286	351,044	330,797
Coating Boro 2%	Dev. Est	52,436	17,580	57,742	84,817	44,095	60,537	22,101	45,948	32,512	23,256
Solvent	Promedio	412,447	429,828	443,720	453,649	469,866	472,269	464,791	471,427	472,777	464,274
Coating Boro 5%	Dev. Est	17,405	2,886	79,933	14,457	77,104	37,840	43,898	22,429	3,083	30,597
Nonofloras	Promedio	112,518	84,266	72,111	76,100	105,246	92,155	87,134	94,350	95,054	89,235
Random Boro 10%	Dev. Est	27,593	22,864	5,835	8,829	27,260	12,835	15,679	22,083	27,004	25,004
Nonofloras	Promedio	84,724	131,792	117,932	92,215	112,430	108,742	108,553	103,814	103,408	106,492
Alimentos Boro 10%	Dev. Est	26,500	41,426	52,980	22,523	41,390	31,998	37,168	23,689	17,384	21,232

Tabla 13. Valores medios de porcentaje de pérdida de masa.

	Semana					
	0	1	2	3	4	
Solvent Casting	Promedio	0	0,5832252	0,990281	1,41993567	1,69883916
	Desv.Est	0	0,07800452	0,13288767	0,23825433	0,3152033
Solvent Casting Boro 2%	Promedio	0	1,07218427	1,43188387	1,67443496	1,92501073
	Desv.Est	0	0,07669621	0,14373217	0,21797813	0,23820773
Solvent Casting Boro 5%	Promedio	0	4,47377642	5,36158905	5,87178074	6,08955531
	Desv.Est	0	0,10670094	0,04694962	0,02688493	0,04305375
Nanofibras Random	Promedio	0	1,50102589	1,87845628	2,92540375	3,30573269
	Desv.Est	0	2,1166254	2,64425037	3,51049579	4,03316709
Nanofibras Random Boro 10%	Promedio	0	7,41536975	8,7984437	9,26009562	10,1815176
	Desv.Est	0	1,02696454	1,32604435	1,5909714	1,63088883
Nanofibras alineadas	Promedio	0	8,03872054	9,37887648	10,1541733	10,6171363
	Desv.Est	0	7,50268726	7,25379443	6,6918191	7,3356128
Nanofibras alineadas Boro 10%	Promedio	0	13,0939994	13,4727813	15,2941868	16,4780351
	Desv.Est	0	2,21206548	1,96705812	0,65383852	0,77068868

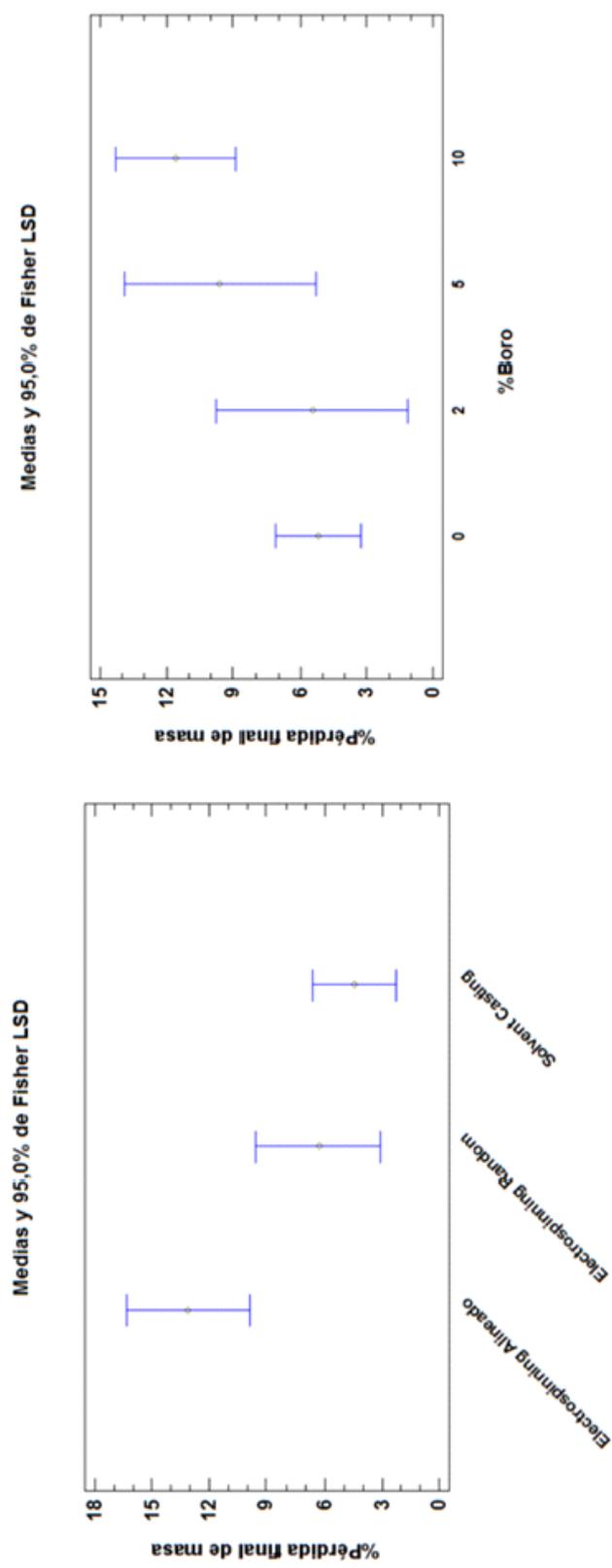


Figura 61. Gráfico de medias LSD para un intervalo de confianza del 95% de los valores de liberación de Boro en función del material.

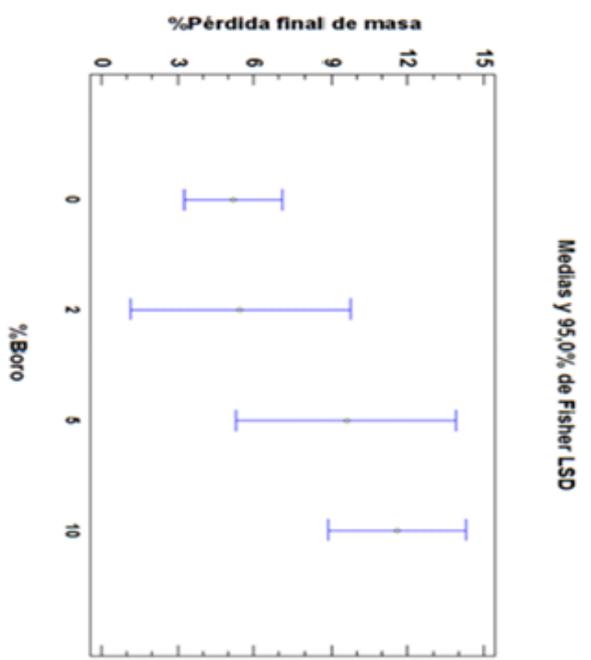
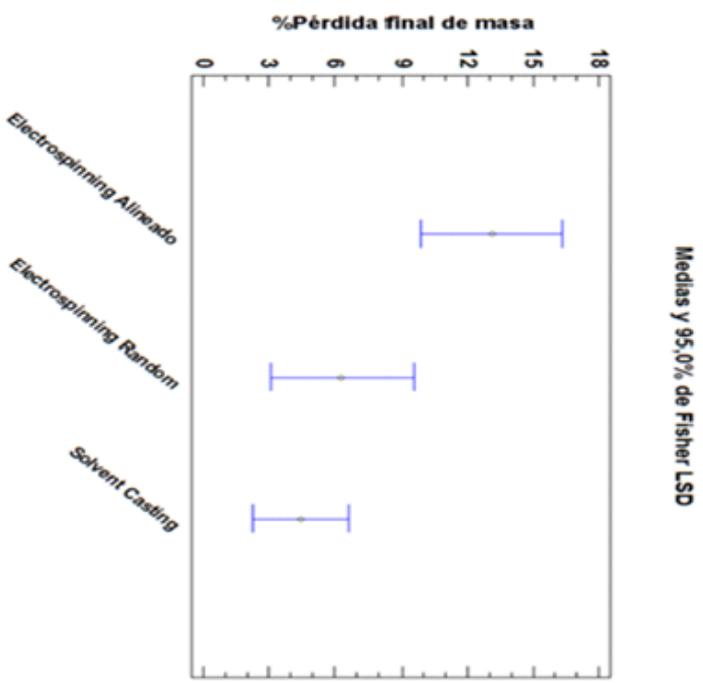


Figura 62. Gráfico de medias LSD para un intervalo de confianza del 95% de los valores de porcentaje de pérdida de masa en función del Boro y de la técnica.

8. Bibliografía

- [1] Persidis, A. (1999). Tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 17(5), 508–10.
- [2] Shi, D. (2014). Biomaterials and tissue engineering. (D. Shi, Ed.) Igarss 2014. Cincinnati: Springer. Issue 5, page 195
- [3] Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering — A review. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1262–1279.
- [4] Kunal Pal, Allan T. Paulson, D errick Rousseau. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, Elsevier Inc, 2009, pages 329-363.
- [5] Garlotta, D. (2002). A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), 63–84.
- [6] Gupta, B., & Revagade, N. (2007). Poly(lactic acid) fiber : An overview, 32, 455–482.
- [7] Ho, M., Lau, K., Wang, H., & Hui, D. (2015). Improvement on the properties of polylactic acid (PLA) using bamboo charcoal particles. *Composites Part B*, 81, 14–25.
- [8] Taylor, P. (2013). *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry Material Design in Poly (Lactic Acid) Systems: Block Copolymers, Star Homo - and Copolymers, and Stereocomplexes* MATERIAL DESIGN IN POLY (LACTIC ACID) SYSTEMS: BLOCK COPOLYMERS, (April 2012), 37–41.
- [9] Hyon, S., Jamshidi, K., & Ikada, Y. (1998). Effects of Residual Monomer on the degradation of DL -Lactide Polymer. *Polymer International*, 46, 196–202.
- [10] Garlotta, D. (2002). A Literature Review of Poly (Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), 63–84.
- [11] Mohammadi, M. S., Bureau, M. N., & Nazhat, S. N. (n.d.). Polylactic acid (PLA) biomedical foams for tissue engineering. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*. Woodhead Publishing Limited.
- [12] Tsuji, H., & Ikarashi, K. (2004). In vitro hydrolysis of poly (l -lactide) crystalline residues as extended-chain crystallites. Part I: long-term hydrolysis in phosphate-buffered solution at 37 C, 25, 5449–5455
- [13] Sutar, A. K. (2015). Synthesis and Characterization of Poly (lactic acid) based Graft Copolymers. *React*, 93, 47–67.
- [14] Benicewicz, B. C., & Hopper, P. K. (1991). Review: Polymers for Absorbable Surgical Sutures--Part II. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 6 (1), 64–94.
- [15] Eenink MJD, Feijien J, Olijslager J, Albers JHM, Rieke JC, Greidanus PJ. Biodegradable hollow fibers for the controlled release of hormones. *J Contr Rel* 1987; 6:225–47.
- [16] Bos RR, Boering G, Rozema FR, Leenlag JW. Reabsorbable poly (L-lactide) plates and screws for fixation of zygomatic fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 1987; 45:751–3.
- [17] Santos AR, Barbanti SH, Duek EAR, Dolder H, Wada RS and Wada MLF (2001). Vero cell growth and differentiation on poly (L-lactic acid) membranes of different pore diameters. *Artif Organs*. 25 (1): 7–13.
- [18] Santos AR, Ferreira BMP, Duek EAR, Dolder H, Wada RS and Wada MLF (2004). Differentiation pattern of Vero cells cultured on poly (L-lactic acid)/poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) blends. *Artif Organs*. 28 (4): 381–9.
- [19] Pavia, F., Rigogliuso, S., La Carrubba, V., Mannella, G. A., Gherzi, G., & Brucato, V. (2012). Poly Lactic Acid Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Chemical Engineering Transactions*, 27, 409–414.

- [20] Ishaug, S. L., Yaszemski, M. J., Bizios, R., & Mikos, a G. (1994). Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28 (12), 1445–53.
- [21] Gugala, Z., & Gogolewski, S. (2004). Protein adsorption, attachment, growth and activity of primary rat osteoblasts on polylactide membranes with defined surface characteristics. *Biomaterials*.
- [22] Yang, F., Murugan, R., Wang, S., & Ramakrishna, S. (2005). Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26(15), 2603–10.
- [23] Chronakis, I. S. (2010). Micro-/nano-fibers by electrospinning technology: Processing, properties and applications. *Micro-Manufacturing Engineering and Technology*.
- [24] Huang, J., & You, T. (2013). Electrospun Nanofibers : From Rational Design , Fabrication to Electrochemical Sensing Applications. *Advances in Nanofibers*, 36–83.
- [25] Tan, S., Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2005). Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process, 46, 6128–6134.
- [26] Rogina, A. (2014). Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science*, 296, 221–230.
- [27] Zhang, X., Rahman, M., Yamamoto, T., & Tsukada, M. (2012). International Journal of Biological Macromolecules Fabrication of silk sericin nanofibers from a silk sericin-hope cocoon with electrospinning method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 337–347.
- [28] Zhou, J., Cao, C., & Ma, X. (2009). International Journal of Biological Macromolecules A novel three-dimensional tubular scaffold prepared from silk fibroin by electrospinning, 45, 504–510.
- [29] Agarwal, S., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49(26), 5603–5621.
- [30] Tao Jiang, Erica J.Carbonate, Kevin W.H.Lo, C. T. L. (n.d.). Electrospinning of nanofibers for tissue bone regeneration.
- [31] Teo, W. E., & Ramakrishna, S. (n.d.). A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, 89.
- [32] Teo, W. E., & Ramakrishna, S. (2005). Electrospun fibre bundle made of aligned nanofibres over two fixed points. *Nanotechnology*, 16 (9), 1878–1884.
- [33] Li, F., Zhao, Y., & Song, Y. (2010). Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning. *Core-She*, (February), 419–438.
- [34] Díaz, J. E., Fernández-nieves, A., & Barrero, A. (n.d.). Fabrication of structured micro and nanofibers by coaxial electrospinning, 012008.
- [35] Zhao, Y., Cao, X., & Jiang, L. (2007). Bio-mimic multichannel microtubes by a facile method. *Journal of the American Chemical Society*, 129 (4), 764–5.

- [36] Naghii, M.R., The significance of dietary boron, with particular reference to athletes, *Nutr. Health*, 1999; 13:31 – 37.
- [37] Rico, P., Rodrigo-navarro, A., & Salmerón-, M. (n.d.). Borax-loaded PLLA for Promotion of Myogenic Differentiation, *Tissue Engineering –Part A Vol 21*, pp 2262-2672.
- [38] Hamilton, E.I., Minsky, M.J., and Cleary, J.J., The concentration and distribution of some stable elements in healthy human tissues from the United Kingdom, *Sci. Total Environ.*, 1972; 1: 341–374.
- [39] Indraprasit, S., Alexander, G.V., and Gonick, H.C., Tissue composition of major and trace elements in uremia and hypertension, *J. Chron. Dis.*, 1974; 27:135–161.
- [40] Nielsen, F.H., Boron- an overlooked element of potential nutritional importance, *Nutr. Today (Jan/Feb)*, 1988; 4–7.
- [41] Hoppe, A., Güldal, N. S., & Boccaccini, A. R. (2011). Biomaterials A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), 2757–2774.
- [42] Haro Durand, L. a., Vargas, G. E., Romero, N. M., Vera-Mesones, R., Porto-López, J. M., Boccaccini, A. R., ... Gorustovich, A. (2015). Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass. *J. Mater. Chem. B*, 3(6), 1142–1148.
- [43] Navarro-Pascual-Ahuir, M., Lerma-García, M. J., Simó-Alfonso, E. F., & Herrero-Martínez, J. M. (2016). Determination of water-soluble vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Control*.
- [44] Devirian, T. A., & Volpe, S. L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (2), 219–231.
- [45] Erazo-Torricelli, R. (2004). Actualización en distrofias musculares. *Revista de Neurología*, 39(9), 860–871.
- [46] Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101.
- [47] Collins, S. D., Smith, R. L., Stewart, K. P., Hagopian, J. G., & Sirota, J. M. (1999). Fourier-transform opticalmicrosystems.pdf, 24(12), 844–846.
- [48] Humboldt University of Berlin. (n.d.). Advanced Lab: DSC Investigation of Polymers.
- [49] Elbeyli, I. Y. (2015). Production of crystalline boric acid and sodium citrate from borax decahydrate. *Hydrometallurgy*, 158, 19–26.
- [50] Kanturk, A., Sari, M., & Piskin, S. (2008). Synthesis , crystal structure and dehydration kinetics of $\text{NaB}(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Korean J. Chem. Eng.*, 25(6), 1331–1337.
- [51] Sheng, S. J., Hu, X., Wang, F., Ma, Q. Y., & Gu, M. F. (2015). Mechanical and thermal property characterization of poly-l-lactide (PLLA) scaffold developed using pressure-controllable green foaming technology. *Materials Science and Engineering C*, 49, 612–622.
- [52] Kazarian, S. G., Vincent, M. F., Bright, F. V, Liotta, C. L., & Eckert, C. A. (1996). Specific intermolecular interaction of carbon dioxide with polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 118(7), 1729–1736.

- [53] Zhang, X., Yu, S., He, Z., & Miao, Y. (2004). Wetting of Rough Surfaces. *Surface Review and Letters*, 11(01), 7–13.
- [54] Kwon IK, Kidoaki S, Matsuda T. Electrospun nano-to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials*. 2005; 26(18):3929-3939
- [55] Sanchez, M. S., Mathot, V. B. F., Poel, G. Vanden, & Ribelles, J. L. G. (2007). Effect of the cooling rate on the nucleation kinetics of poly(L-lactic acid) and its influence on morphology. *Macromolecules*, 40, 7989–7997.
- [56] Mathew, A. P., Oksman, K., & Sain, M. (2006). The effect of morphology and chemical characteristics of cellulose reinforcements on the crystallinity of polylactic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(1), 300–310.
- [57] Wang, Y., Gómez Ribelles, J. L., Salmerón Sánchez, M., & Mano, J. F. (2005). Morphological Contributions to Glass Transition in Poly (L -lactic acid). *Macromolecules*, 38, 4712–4718.
- [58] Hernández Sanchez, F., Molina Mateo, J., Romero Colomer, F. J., Salmerón Sánchez, M., Gómez Ribelles, J. L., & Mano, J. F. (2005). Influence of low-temperature nucleation on the crystallization process of poly(L-lactide). *Biomacromolecules*, 6(6), 3283–90.
- [59] Deplaine, H., Acosta-Santamaría, V. A., Vidaurre, A., Gómez Ribelles, J. L., Doblaré, M., Ochoa, I., & Gallego Ferrer, G. (2014). Evolution of the properties of a poly(L-lactic acid) scaffold with double porosity during in vitro degradation in a phosphate-buffered saline solution. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(20), 1–10.
- [60] Zhang, X., Espiritu, M., Bilyk, A., & Kurniawan, L. (2008). Morphological behaviour of poly(lactic acid) during hydrolytic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93(10), 1964–1970.
- [61] Hakkarainen, M., Albertsson, A. C., & Karlsson, S. (1996). Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo- and copolymers of PLA and PGA. *Polymer Degradation and Stability*, 52(3), 283–291.
- [62] Schedl, L. (2002). 26 Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion, 23, 4221–4231.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

PLIEGO DE CONDICIONES

Condiciones generales

El pliego de condiciones es un documento de carácter vinculante que tiene como objetivo registrar las condiciones técnicas, legales, administrativas y facultativas necesarias para que el alumno pueda llevar a cabo la ejecución del proyecto de una forma correcta. Dicho documento, además de las condiciones generales facultativas, expresa los términos de la relación contractual entre el alumno y los promotores del proyecto (sus directores).

Al ser un documento contractual permite garantizar de una forma legal la protección tanto del alumno como de los directores y aporta un respaldo en el cumplimiento de los derechos y de las obligaciones de ambas partes.

El pliego de condiciones que se presenta a continuación se subdivide en **condiciones facultativas, legales y económicas**.

Condiciones generales facultativas

Facultades del promotor:

Los promotores de este Trabajo Final de Máster (TFM) son el Dr. Don. Ramón Martínez Máñez y la Dra. Dña. Patricia Rico Tortosa, que actúan en representación del Departamento de Química y del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de Valencia (UPV) dirigiendo el proyecto.

Los promotores están sujetos al cumplimiento en todo momento de la normativa de la Universitat Politècnica de València. Ésta, a su vez, será complementada por el reglamento de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales (ETSII) en toda labor de dirección durante el desarrollo de este trabajo.

La referida normativa les permite supervisar y modificar, en caso de ser necesario, el trabajo realizado durante la ejecución de este Trabajo Final de Máster. De acuerdo a la normativa los directores tienen plena autoridad para autorizar el envío del trabajo a los órganos de evaluación de la ETSII en caso de encontrarlo apto para su evaluación.

Obligaciones y derechos del proyectista:

Durante el desempeño de este Trabajo Final de Máster *el alumno* tiene el deber cara a los directores del TFM de cumplir los siguientes puntos:

- Actuar siempre bajo las indicaciones, la supervisión y la aprobación de sus directores, estando el desempeño de su trabajo en continua supervisión por los mismos.
- El alumno estará, en todo momento, sujeto a la normativa vigente de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la UPV. La dirección velará, igualmente, de que el alumno cumpla dicho normativa en todas las etapas que componen el trabajo.
- Respetar y mantener la confidencialidad de los resultados obtenidos y de los protocolos desarrollados en su estancia en los laboratorios. Asimismo, debe respetar los derechos de autoría otorgados al Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la UPV en el contrato de cesión de derechos firmado por el alumno al inicio de su estancia.
- Informar regularmente a sus directores del estado del Trabajo Final de Máster, de los resultados obtenidos y de las conclusiones obtenidas. De esta forma facilita la labor de sus directores de poder elaborar una corrección si el progreso del trabajo se alejara de lo establecido en la planificación del proyecto.
- Mostrar iniciativa y aptitudes durante la ejecución del proyecto, buscando soluciones alternativas a los problemas que puedan originarse durante la elaboración del trabajo. En todo momento es obligación del alumno consultar con sus directores cualquier solución alternativa o modificación respecto a las especificaciones originales del trabajo.

El pliego de condiciones además de estipular las obligaciones que tiene el alumno, respecto a los promotores del proyecto, también refleja los derechos de los que goza el alumno para el correcto desempeño de su trabajo y que a continuación se exponen:

- El organismo docente (Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, para el cual el alumno está realizando el proyecto, debe facilitarle las instalaciones, equipos y materiales necesarios para la realización del trabajo en cada una de las etapas que lo componen.
- De acuerdo con lo establecido en la Ley de Prevención de Riesgos Laborales (anteriormente citada) es deber del centro el garantizar la seguridad y la higiene del alumno proyectista. Para ello adaptará sus instalaciones según lo recogido en dicha normativa y se instruirá al alumno en los procedimientos necesarios que garanticen estas condiciones.
- El centro facilitará al alumno, en todo momento, la asistencia para solucionar aquellos problemas de índole técnica no previstos en la etapa de planificación del proyecto y que no puedan ser imputables a un mal proceder en el desempeño por parte del alumno.
- Los promotores del proyecto mantendrán en todo momento al alumno informado de sus derechos legales y de las modificaciones que se hayan decidido hacer con respecto a las especificaciones iniciales.

Plazos de ejecución del Trabajo Final de Máster:

En lo referente a los plazos de iniciación y finalización del Trabajo Final de Máster serán los promotores y el alumno los que, por acuerdo mutuo, fijarán dichos plazos. Ante la posibilidad de que el alumno deba modificar el plazo de finalización por cambios en la planificación, necesidad de recopilar resultados o complicaciones técnicas que obstaculicen la entrega en la fecha original, puede realizar dicha modificación siempre que este cambio sea acordado y aprobado por los promotores.

Condiciones generales legales

Medidas de seguridad en el trabajo:

El alumno tiene la obligación de cumplir la Ley de Prevención de Riesgos Laborales, referenciada anteriormente en el punto 3 de la Memoria Descriptiva, adoptando las medidas de seguridad necesarias para garantizar su propia seguridad y protección, así como la del resto del personal. Por contrapartida, el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular tiene la obligación de asegurarse de que el alumno adquiere los conocimientos sobre dichas medidas y de que durante la ejecución del Trabajo Final de Máster se rige por su cumplimiento.

Dentro de las medidas referidas el alumno también debe ser conocedor de aquellas relacionadas con el manejo de los equipos de trabajo, de la manipulación de sustancias peligrosas y de los equipos de protección individual (EPIs) y colectiva (EPCs).

Propiedad intelectual y derechos de autoría:

El estudiante cederá a la Universitat Politècnica de València los derechos sobre todos los resultados que haya obtenido como consecuencia de las actividades que realice en su trabajo. La UPV tendrá plena potestad para conservar la confidencialidad de los resultados obtenidos o divulgarlos, publicarlos y defenderlos mediante títulos de propiedad intelectual.

Al facilitar la UPV las instalaciones necesarias para la obtención de dichos resultados, cualquier título de propiedad industrial o intelectual que se solicite se inscribirá a nombre de la UPV o de quien ésta designe. Es deber del alumno firmar todos los documentos pertinentes para solicitar y tramitar dichos títulos, teniendo pleno derecho a figurar en éstos como autor.

En contrapartida la Universitat Politècnica de València se compromete a cubrir los gastos de solicitud y tramitación del proyecto, así como, los costes de mantenimiento de aquellas instalaciones donde realice su trabajo. De acuerdo a la normativa de la UPV en materia de propiedad industrial e intelectual, si los resultados obtenidos del trabajo dieran potenciales beneficios, el alumno dispone de pleno derecho a participar en la explotación de éstos en función de su aportación a la obtención de los resultados.

Reconocimiento de marcas registradas en la ejecución del Trabajo Final de Máster:

Tanto el alumno como los promotores del Trabajo Final de Máster reconocen públicamente los derechos de autor de la bibliografía consultada y empleada en este trabajo, así como de aquellas marcas registradas de equipos, procedimientos y materiales que se empleen en el desarrollo del proyecto.

Rescisión del contrato vinculante del proyecto:

Los promotores del proyecto poseen pleno derecho a rescindir el contrato vinculante cuando se produzca una de las siguientes circunstancias:

- Un retraso excesivo e injustificado por parte del alumno durante la ejecución del proyecto. Igualmente, podrán rescindir la relación contractual si se produce un abandono injustificado del proyecto por parte del alumno.
- La rescisión contractual puede tener lugar de mutuo acuerdo entre el alumno y sus promotores. Dicho acuerdo se podrá realizar siempre y cuando los motivos invocados para el abandono, proporcionados por cada de una de las partes implicadas, no produzcan ningún perjuicio recíproco. En caso de no resultar viable una rescisión diplomática se actuará de acuerdo con lo establecido en los estatutos de la Universitat Politècnica de València.

Condiciones generales económicas

Presupuesto del Trabajo Final de Máster realizado:

Dentro de las obligaciones que tiene el alumno proyectista se encuentra la de suministrar a los promotores del proyecto un presupuesto que refleje fielmente el coste de sus actividades realizadas para el Trabajo Final. Dicho presupuesto debe de contener precios actuales de los materiales empleados, del salario del personal que haya participado y, en caso de haber empleado maquinaria, la amortización realizada de ésta desde el momento de su compra.

Honorarios del alumno proyectista:

El Trabajo Final de Máster es un trabajo académico donde el alumno reflejará los conocimientos adquiridos en el Máster en Ingeniería Química a través de su labor realizada en el Centro de Biomateriales. Dada su naturaleza académica y a que es la UPV quien suministra los equipos y los materiales empleados el alumno no recibirá honorarios ni otras retribuciones, sean de percepción dineraria o en especie.

Condiciones particulares

El alumno debe especificar en esta parte del pliego de condiciones la siguiente información:

- Las propiedades de los reactivos empleados en el desarrollo del proyecto, incluirá sus características de peligrosidad y las medidas necesarias para una correcta manipulación.
- Especificaciones técnicas de los equipos que se hayan empleado en todas las etapas que componen el desarrollo experimental de su Trabajo Final de Máster.
- Condiciones particulares en la ejecución de cada una de las etapas que componen el proyecto.
- Aquellas condiciones en materia de gestión de residuos (de acuerdo con la normativa establecida en el R.D 952/1997, de 20 de junio, anteriormente citado en el punto 3 de la memoria descriptiva) por las cuales el alumno ha de gestionar los residuos generados como consecuencia de su actividad en función de sus características.

Reactivos químicos empleados

Dado el potencial riesgo para la salud y para la seguridad que implica trabajar con sustancias químicas, es de obligatorio cumplimiento que el alumno informe a los promotores de la naturaleza y propiedades de aquellas especies que se empleen en este Trabajo Final de Máster. Para ofrecer una información certera y veraz se han consultado las fichas de seguridad (FDS) de los productos, facilitadas por las casas comerciales que los han suministrado al Centro de Biomateriales.

Ácido Poliláctico L

Nombre común		Nombre IUPAC		
Fórmula Química		Número CAS		
(C ₃ H ₆ O ₃) _n		26100-51-6		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
30000-60000	Sólido	-----	-----	-----
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad (en agua a 20°C)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
	-----	-----	-----	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
Pictogramas				

Cloroforno

Nombre común		Nombre IUPAC		
Cloroforno		Triclorometano		
Fórmula Química		Número CAS		
CHCl ₃		67-66-3		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
119,38	Líquido incoloro	-63	61	213
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad en agua a 20°C (g/L)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
1,4910	-----	8	-----	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
H331 - H372 - H351 - H361d - H302 - H315 - H319		P260 - P261 - P305+P351+P338 - P321 - P405 - P501a		
Pictogramas				
Cancerígeno, mutágeno (GHS08)	Toxicidad aguda categoría 1 (GHS06)			
				

Hexafluoroisopropanol

Nombre común		Nombre IUPAC		
Hexafluoroisopropanol		1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol		
Fórmula Química		Número CAS		
C ₃ H ₂ F ₆ O		920-66-1		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
168,04	Líquido incoloro	-4	59	160
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad (en agua a 20°C)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
1,596 g/cm ³	-----	-----	-----	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
H302, H314, H361		P26-P280-P301+P312+P330- P303+P361+P353- P304+P340+P310-P305+P351+P338		
Pictogramas				
Cancerígeno, mutágeno (GHS08)	Sustancia corrosiva (GHS05)	Toxicidad aguda categoría 4 (GHS07)		
				

Tetraborato sódico

Nombre común		Nombre IUPAC		
Borax		Tetraborato de sodio decahidratado		
Fórmula Química		Número CAS		
B ₄ Na ₂ O ₇ ·10H ₂ O		1303-96-4		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
381,37	Cristal sólido blanco	62	-----	-----
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad (en agua a 20°C)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
1,73	-----	38,1 g/L	-----	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
H360FD		P201-P308+P313		
Pictogramas				
Cancerígeno, mutágeno (GHS08)				
				

Azometina

Nombre común		Nombre IUPAC		
Azometina monosódica hidratada		4-Hidroxi-5-(2-hidroxibenzilideneamino)-naphthaleno-2,7-ácido disulfónico monosódico		
Fórmula Química		Número CAS		
C ₁₇ H ₁₂ NNaO ₈ S ₂ ·xH ₂ O		206752-32-1		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
445,40	Polvo anaranjado	-----	-----	-----
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad (en agua a 20°C)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
-----	-----	-----	-----	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
H315-H319-H335		P261-P305+P351+P338		
Pictogramas				
Toxicidad aguda categoría 4 (GHS07)				
				

Ácido ascórbico

Nombre común		Nombre IUPAC		
Vitamina C		5-((s)-1,2-dihidroxi-etil)-3,4-dihidroxifuran-2(5H)-ona		
Fórmula Química		Número CAS		
C ₆ H ₈ O ₆		50-81-7		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
176,12	Cristalino	192	-----	
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad (en agua a 20°C)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
-----	-----	176	-----	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
-----		-----		
Pictogramas				

Etanol

Nombre común		Nombre IUPAC		
Alcohol etílico		Etanol		
Fórmula Química		Número CAS		
C ₂ H ₆ O		64-17-5		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
46,07	Líquido incoloro	-114,5	78	59
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad en agua a 20°C (g/L)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
0,79	1,2	1	425	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
H225		P210-P241-P280-P240-P303+P361+P353-P501		
Pictogramas				
Sustancia inflamable (GHS02)				
				

Acetona

Nombre común		Nombre IUPAC		
Acetona		2-Propanona		
Fórmula Química		Número CAS		
C ₃ H ₆ O		67-64-1		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
58,08	Líquido incoloro	-95	56	233
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad (en agua a 20°C)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
0,79	-----	Totalmente miscible	465	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
H225 - H319 - H336 - EUH066		P210 - P241 - P303+P361+P353 - P305+P351+P338 - P405 - P501a		
Pictogramas				
Toxicidad aguda categoría 4 (GHS07)	Sustancia inflamable (GHS02)			
				

Ácido Acético Glacial

Nombre común		Nombre IUPAC		
Ácido Acético		Ácido Etanoico		
Fórmula Química		Número CAS		
C ₂ H ₄ O ₂		64-19-7		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
60,05	Líquido incoloro	17	117	15,4
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad (en agua a 20°C)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
1,05	-----	Totalmente miscible	485	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
H314 - H226		P210 - P241 - P303+P361+P353 - P305+P351+P338 - P405 - P501a		
Pictogramas				
Sustancia corrosiva (GHS05)	Sustancia inflamable (GHS02)			
				

Acetato potásico

Nombre común		Nombre IUPAC		
Acetato de potasio		Etanoato de Potasio		
Fórmula Química		Número CAS		
C ₂ H ₃ KO ₂		127-08-2		
Propiedades físico-químicas (medidas a 25°C)				
Peso molecular (g/mol)	Estado ambiental	Temperatura fusión (°C)	Temperatura ebullición (°C)	Presión de vapor a 20°C (hPa)
98,14	Sólido cristalino blanco	305	-----	<0,000001
Densidad relativa a 25°C (g/cm ³)	Viscosidad	Solubilidad en agua a 20°C (g/L)	Temperatura autoignición (°C)	Temperatura descomposición (°C)
1,57	-----	98,2	No arde	-----
Medidas para la manipulación				
Frases H		Frases P		
-----		-----		
Pictogramas				
-----		-----		
-----		-----		

Especificaciones de los equipos

A continuación se exponen todas las especificaciones necesarias de los diferentes equipos que se han empleado durante la realización del TFM. Dichos equipos cumplen las especificaciones requeridas en cuanto a su uso, compra, fabricación y manipulación por el personal perteneciente al laboratorio.

Balanza de precisión

Capacidad máxima de pesada (g)	220
Rango de legibilidad (mg)	0,1
Rango de tara (g)	-220
Desviación de linealidad máxima (mg)	0,2
Reproducibilidad máxima (desviación estándar) (mg)	0,1
Tiempo de respuesta máximo (s)	4
Temperatura ambiental de operación (oC)	5-30
Deriva máxima de la sensibilidad entre 10-30 oC	1x10 ⁻⁶
Diámetro del plato de pesaje (mm)	80
Altura de la cámara de pesaje (mm)	225
Peso (kg)	6,6
Dimensiones (mm ³)	204 x 297 x 332
Dimensiones componente electrónica (mm ³)	134 x 51 x 155
Peso de calibración externa (g)	200
Alimentación eléctrica	AC
Frecuencia (Hz)	48-63
Voltaje (V)	230
Consumo eléctrico (VA)	8

Agitador de ultrasonidos

Volumen (L)	0,020-0,9
Potencia (W)	200
Frecuencia (KHz)	20
Dimensiones (mm ³)	250 x 256 x170
Peso (kg)	2,7
Alimentación eléctrica	AC
Voltaje (V)	230
Frecuencia (Hz)	50/60

Bomba de vacío de aceite

Caudal nominal de bombeo (m ³ /h)	3
Presión de vacío máximo (mbar/torr)	5·10 ⁻²
Presión de vacío máximo con gas lastre (mbar/torr)	8·10 ⁻²
Tolerancia al vapor de agua (mbar)	40
Rango de temperatura de operación (°C)	12-40
Rango de temperatura de almacenamiento (°C)	-10-60
Capacidad mínima/máxima del aceite (L)	0,3
Contrapresión máxima (bar)	1,1
Conexiones de entrada	Bridas pequeñas <i>modelo KF</i> <i>DN 16</i>
Conexiones de salida	Boquilla externa <i>modelo DN</i> <i>8-10 mm</i>
Potencia nominal del motor (kW)	0,18
Velocidad nominal del motor a 50 Hz (min ⁻¹)	2800
Grado de protección	IP 40
Dimensiones (mm ³)	316 x 125 x 190
Dimensiones rodete (mm)	70 x 120
Peso de la bomba (kg)	11,4
Nivel de ruido a 50 Hz (dBA)	43
Alimentación eléctrica	AC
Voltaje (V)	230
Frecuencia (Hz)	50/60 Hz

Agitador magnético

Velocidad de agitación (rpm)	20-1200
Capacidad de agitación (agua) (L)	2
Sistema de regulación	Microprocesador de 16 bits
Consumo máximo (W)	5
Tipo de regulación	Soft Sart
Indicadores de la interfaz	LCD White-blue 4 x 20
Control de mandos	Pulsadores de membrana
Máxima humedad relativa de operación	80%
Duración en operatividad	100%
Protección	IP 53
Fusible (A/V)	1/253
Clase de protección	Protección a tierra
Dimensiones (mm ³)	360 x 450 x 60
Peso (kg)	4
Alimentación eléctrica	AC
Voltaje (V)	230
Frecuencia (Hz)	50/60

Estufa eléctrica

Capacidad (L)	145
Puerta	Metálica
Rango de temperatura de Operación (°C)	5-250
Estabilidad a 100 °C (°C)	±0,25
Homogeneidad a 100 °C (°C)	±1
Error de consigna	±2%
Resolución (°C)	1
Tiempo de alcance del valor consigna de 100°C min)	17
Tiempo de recuperación (min)	10
Renovaciones de aire por hora	12
Dimensiones (cm ³)	70 x 95 x 72
Dispositivos Guía	8
Consumo eléctrico (W)	2000
Peso (kg)	74
Alimentación eléctrica	AC
Voltaje (V)	230
Frecuencia (Hz)	50/60

TGA/DCS 2 Mettler-Toledo

Horno interno	145
Rango de temperatura de Operación (°C)	25-1100
Exactitud de temperatura ⁽¹⁾ (K)	± 0,3
Precisión de temperatura ⁽²⁾ (K)	± 0,2
Resolución temperatura del horno	0,001
Tiempo de calentamiento completo de horno (25 °C -1100 °C) (min)	10
Tiempo de enfriamiento completo de horno (1100 °C -100 °C) (min)	≤ 11
Tiempo de enfriamiento con Helio (1100 °C -100 °C) (min)	17
Velocidad de calentamiento (K/min)	150
Velocidad de enfriamiento (K/min)	-20
Volumen de cápsula de muestra (µL)	900
Cambiador muestras	Robotizado
Accesorios	Espectrómetro de masas
Flujo interno de gas (mL/hr)	0-200
Tiempo de la señal (s)	74
Alimentación eléctrica	AC
Voltaje (V)	230
Frecuencia (Hz)	50/60

Balanza de precisión interna DCS/TGA XP1

Capacidad máxima de pesada (g)	≤1
Resolución (μg)	1
Exactitud de medida (%)	0,005
Precisión de medida (%)	0,0025
Anillos internos de pesaje	2
Reproducibilidad de curva blanco (μg)	±10 en el rango de temperaturas

Motor trifásico WEG 356 WIMES

Velocidad máxima (rpm)	1500
Par aplicado (N·m)	1,2
Voltaje (V)	230
Intensidad (A)	1,72

Variador de frecuencia WEG CFW08PLUS

Rango de temperatura ambiental de Operación (°C)	0-50 con pérdidas de corriente (2%) cada 1°C
Humedad ambiental de operación (%)	5-90 sin condensación
Altitud ambiental de operación (m)	Hasta 4000 con pérdidas de corriente (10%) cada 1000
Procesador	16 Bytes
Transmisión de potencia	Sinusoidal con transistores IGBT de 2,5 ,5 ,10 o 15 kHz
Factor de potencia	0,985
Rango de frecuencia capaz de transmitir (Hz)	0-300
Capacidad de funcionamiento por encima del nominal (%)	150 durante 60 segundos cada 10 minutos
Interfaz	4 marcadores digitales, 2 indicadores LED y 8 puertos de conexión
Alimentación eléctrica	AC
Voltaje (V)	230
Frecuencia (Hz)	50/60

Fuente de alta tensión Glassman PS/FC30P04

Voltaje alimentación (V)	220
Intensidad (A)	<7
Frecuencia (Hz)	48-63
Rango de temperatura ambiental de Operación (°C)	-20 a 40 en operación y de almacenamiento entre -40 a +85
Polaridad	Permite positivo, negativo e invertir polaridades
Onda electromagnética emitida al entorno	<0,02% de la tensión nominal +300 mV cuando está a plena carga
Regulación de la corriente	Incertidumbre inferior 0,1% a cualquier condición de funcionamiento
Estabilidad	Variaciones del 0,01% tras 30 min de calentamiento y del 0,05% tras 8 horas de funcionamiento
Factor de potencia	>0,995
Constante de tiempo de incremento/descenso del potencial aplicado	50 ms con un incremento de la resistencia del 10% al aplicar tensiones elevada
Exactitud de lectura (%)	Variaciones del 0,5%

Equipo de medida de ángulo de contacto DATAPHYSICS OCA 15EC

Voltaje alimentación (V)	240
Frecuencia (Hz)	50-60
Consumo eléctrico (W)	70
Dimensiones máximas permitidas de muestra (mm ³)	220 x ∞ x 70
Dimensiones de tabla de medición (mm ²)	100 x 100
Rango de medida del ángulo de contacto (°)	0...180
Incertidumbre de medida del equipo de vídeo (°)	± 0,1
Rango de medida de la tensión superficial (mN/m)	1·10 ⁻² ...2·10 ⁻³
Resolución mínima (mN/m)	± 0,01
Dimensiones del equipo (L x B x H , mm ³)	550 x 160 x 365
Peso (kg)	14
Peso máximo de medida	3
Campo de visión (mm ²)	1,05 x 0,66 ... 6,72 x 4,25
Resolución cámara (pixels) (frame/s)	752 x 480 311
Distorsión óptica (%)	<0,05

Spin Coater CEE^R 200X

Velocidad máxima de giro (rpm)	12000
Aceleración de giro (rpm/s)	Hasta 23000 con un sustrato en recipiente de 200 mm
Resolución de velocidad de giro (rpm)	0,2
Repetibilidad de velocidad de giro (rpm)	0,2
Recipiente	Polietileno con anillo integrado para eliminar fugas de material
Dimensiones del equipo (cm ³)	33,65 x 48,26 x 30,48
Peso (kg)	45,36
Presión de operación (mmHg)	20-25
Voltaje alimentación (VAC)	240
Frecuencia (Hz)	50-60
Intensidad (A)	6
Consumo eléctrico (W)	655

Spectrofotómetro VICTOR3 Perkin-Elmer

Fuentes de luz	Lámpara halógena de Tungsteno Lámpara de destellos de Xénon
Rango de temperatura de trabajo (°C)	Temperatura ambiente hasta 45 (incrementos de 0,1 si se calienta)
Volumen de muestra (µL)	5-350
Falta de exactitud (%)	<5 para 5 µL, <0,5 para 50 µL, <0,05 para 350 µL
Falta de precisión (%)	<1,4 para 5 µL, <0,2 para 50 µL, <0,02 para 350 µL
Dimensiones del equipo (mm ³)	383 x 590 x 490
Peso (kg)	49
Longitud de la fotometría (nm)	405
Rango de medida fotometría a 405 nm (A)	0-4
Exactitud fotometría a 405 nm (%)	<2 en el rango 0-2 A
Precisión fotometría a 405 nm (%)	<0,05 en el rango 0-2 A
Consumo eléctrico (W)	250

Microscopio óptico NIKON ECLIPSE TS100

Sistema óptico	CFI60
Distancia focal (mm)	60
Foco	Objetivo con movimiento vertical
Distancia de carrera (mm/rotación)	37,7
Distancia fina (mm/rotación)	0,2
Dimensiones (mm ³)	170 x 225 x 195
Binoculares	0,2
Distancia interpupilar (mm)	50-75
Inclinación respecto a plataforma de muestra (°)	45 respecto a horizontal
Distancia respecto a plataforma de muestra (mm)	400
Filtros	45 mm NCB11, ND8 y GIF
Iluminación	Lámpara halógena de 6V y 30W sobre filtro absorbente de calor

Condiciones de ejecución

A continuación se describen las condiciones particulares que debe tener en cuenta el alumno durante cada una de las etapas que componen el desarrollo experimental. Dichos procedimientos abarcan protocolos para una manipulación de los equipos segura e higiénica.

Limpiezas del material y mantenimiento en el laboratorio

El alumno al comenzar su estancia en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular debe recibir formación específica sobre los protocolos de limpieza y seguridad. En dichos protocolos se le informa de las metodologías de limpieza de los distintos utensilios de laboratorio, en función de la naturaleza de las especies manipuladas. Asimismo, se le instruirá también en el correcto manejo de los diferentes elementos de protección individual y colectiva.

Al inicio de la estancia del alumno en el laboratorio, el Centro de Biomateriales se encargará de proporcionarle dichos EPIs formados por gafas de seguridad, una bata blanca de algodón, una máscara con filtro antigases y otra con filtro antipartículas. Independientemente del préstamo de dichos equipos de protección individual por parte del Centro de Biomateriales, el alumno siempre ha de acudir a su puesto de trabajo con una indumentaria adecuada. Dicha indumentaria consiste en pantalones largos y calzado de pie cubierto con el fin de evitar cualquier contacto de la piel con reactivos químicos.

En caso de que el alumno padezca problemas de visión debe tener la precaución adicional de llevar gafas debajo de las gafas de seguridad. Se prohíbe el uso de lentillas debido a la irritación aguda que se puede producir si el alumno trabaja con reactivos que le puedan salpicar en los ojos o se encuentre expuesto a una fuente intensa de calor que le provoque desecación.

En caso de salpicadura o derrame accidental de alguna sustancia química sobre el alumno, el Centro de Biomateriales dispone de duchas de lavado y chorros de agua oculares. El alumno debe lavar la zona afectada con abundante agua fría y acudir inmediatamente al médico, facilitándole toda la información sobre la sustancia del derrame con el fin de realizar un diagnóstico acertado y un tratamiento eficaz.

El alumno ha de contribuir a la reposición de reactivos en el *stock* del Centro de Biomateriales. Para ello dará de baja cualquier reactivo que se agote y lo notificará inmediatamente para su compra y reposición. De forma análoga se procede en caso de rotura accidental del material de trabajo, se le debe notificar al técnico del laboratorio para que lo reponga en el menor tiempo posible.

Condiciones durante la fabricación de la membrana

La fabricación de la membrana se realiza mediante la técnica del *electrospinning*, que emplea una fuente de alta tensión. Es por ello que se deben seguir las siguientes instrucciones para poder realizar esta técnica de forma segura:

- El alumno, antes de empezar, debe ir provisto de los EPIs. Es muy recomendable llevar doble capa de guantes para evitar descargas no deseadas del *electrospinning*, ya que el aislamiento de la cabina de trabajo no es total y tras un tiempo prolongado de trabajo se carga eléctricamente.
- Jamás debe empezar a suministrar el voltaje hasta haber conectado todo el circuito y poder asegurar que las pinzas están bien sujetas.
- Se manipularán las disoluciones en la campana de extracción de gases y equipado con la máscara de gases.
- El alumno debe exhibir especial cuidado de no dejar frascos de disoluciones inflamables en la cabina del *electrospinning*. Como bien se ha comentado anteriormente, el aislamiento no es perfecto y pasado un cierto tiempo la cabina se carga eléctricamente, pudiendo provocar una descarga electrostática e inflamar la disolución. Igualmente, ha de ser muy cuidadoso ante el vertido accidental, cortando el suministro eléctrico inmediatamente y avisando al responsable del equipo.
- Con el fin de mantener la integridad de la fuente de alimentación, se debe de apagar ésta al cesar la actividad, siempre bajando la rueda de aplicación del voltaje a 0 previamente. De no hacerse así, en el momento del encendido la fuente soportará picos de tensión de miles de voltios que, dará como resultado el deterioro del equipo.
- Igualmente, el alumno debe asegurarse en todo momento de la correcta sujeción de los colectores rotatorios al motor eléctrico antes de empezar. Dada la elevada velocidad de giro con la que se trabaja para la obtención de fibras alineadas y la peligrosidad de trabajar con un elemento en movimiento, es preciso que trabaje con la guillotina de la cabina bajada durante todo el periodo que dure su actividad.
- Se debe limpiar habitualmente la cabina del *electrospinning*, cambiando periódicamente la capa protectora de plástico con el fin de mantener el aislamiento eléctrico y que aumente drásticamente la frecuencia de las descargas electrostáticas al usuario.
- El alumno alumno debe tener precaución, en la etapa de limpieza del montaje, y emplear guantes térmicos, puesto que se utiliza agua a elevada temperatura para limpiar los tubos de teflón.

Condiciones durante la fabricación de los films de PLLA por la técnica del Solvent Casting y el Spin Coating:

- El alumno debe ir provisto de los EPIs para la ejecución de cualquiera de las dos técnicas.
- El trasvase de la disolución sobre las placas Petri se debe hacer con la máscara de gases puesta y en la campana de extracción de gases activada. El alumno debe dejar bien delimitada su zona de trabajo para no dificultar el trabajo del resto del personal e impedir que pueda verse afectado su sistema material durante la evaporación del solvente.
- El alumno debe asegurarse, al realizar los *films* con la técnica del *Spin Coating*, de que esté conectada la campana de extracción de la cabina de trabajo y la bomba de vacío (situada detrás del equipo para evitar fugas de solvente y con la circulación del N₂ activada) para evitar la contaminación indeseada de las muestras. Asimismo, comprobar la adecuada adherencia del cubre de vidrio a su correspondiente boquilla de aspiración y de que se ajusta con la velocidad de rotación adecuada.

Condiciones para la correcta medida de la liberación

- El alumno, al terminar de preparar la mezcla de *azometina*, debe realizar la recta patrón y debe realizarla nuevamente (en los tiempos más elevados) para evitar el ruido que produce el deterioro de la *azometina* con el tiempo.
- Al elaborar el *buffer*, que aporta las condiciones ácidas, debe tener cuidado ya que la mezcla se realiza a partir de ácido acético glacial (pureza >99%). Para una correcta medida del pH-metro empleado se debe contrastar sus medidas con patrones conocidos de pH preparados por el personal del laboratorio. Al finalizar la toma de dichas medidas debe de limpiar la sonda con agua destilada y guardarla en su funda protectora con una disolución de KCl.

Condiciones para los ensayos de caracterización térmica

- El alumno ha de poner una cantidad másica determinada a la hora de realizar los ensayos térmicos para obtener resultados con el mínimo ruido posible. Para el *DSC 823e de Mettler-Toledo* el rango necesario es entre 6 y 20 mg de muestra y para el *TGA /DSC 2* son entre 2 y 8 mg.
- A la hora de maniobrar el DSC poner, previamente, las muestras encapsuladas al vacío para eliminar la humedad que pueda dar lugar a que aparezca ruido en la señal.

Condiciones para el ensayo de ángulo de contacto

El alumno debe asegurarse de emplear para cada líquido su correspondiente jeringa. Un error en dicho uso dará lugar a contaminación de los capilares y a error en las medidas obtenidas.

Con el fin de asegurar una medida limpia, se recomienda ajustar la iluminación tanto del equipo como de la habitación. De esa manera no habrá posibilidad de que la cámara confunda sombras a la hora de trazar el perfil de medida de la gota.

Condiciones para la gestión de residuos

- El alumno es informado, en el momento de su admisión, acerca de la metodología llevada a cabo por el Centro de Biomateriales para la recogida y la gestión de los residuos producidos.
- El Centro de Biomateriales pone a disposición de todo el personal investigador contenedores de recogida selectiva para papel/cartón, plástico y restos orgánicos, estando éstos debidamente etiquetados según el código de color (NORMATIVA, apartado 3 de la Memoria Descriptiva).
- De acuerdo con lo estipulado en la normativa de gestión de residuos peligrosos, el Centro de Biomateriales debe poner a disposición de todo el personal bidones para los residuos líquidos. Dichos recipientes deben ir debidamente etiquetados en función del grupo al que pertenezcan los residuos líquidos que en él se verterán. Ante la controversia que pueda generar una disolución que contenga sustancias de diferentes grupos el bidón a verter será siempre el del grupo más restrictivo.
- En el momento de alcanzar los 2/3 de altura del bidón de residuos líquidos, éste debe cambiarse. El alumno debe velar por el cumplimiento de esta norma y cambiarlo cuando la circunstancia lo requiera. Para ello debe disponer de un nuevo bidón que etiquetará debidamente con la información perteneciente al grupo de residuos y los datos de contacto del Área de Medioambiente de la UPV. En el caso particular de los bidones sólidos, éstos se cambiarán cuando se haya llenado el bidón del todo, pudiendo sellarlo con facilidad.
- En el caso particular de los monómeros de la familia de los acrilatos, el alumno debe limpiar los recipientes donde hubieran estado con acetona, de forma continua, y retirar los restos sólidos con papel absorbente. Cualquier material contaminado por el contacto con dichos monómeros se debe introducir en una bolsa zip de plástico, y guardarse en un contenedor específico para materiales contaminados con monómeros.

- Si en el transcurso de las actividades el alumno rompe vidrio o éste queda contaminado sin poder ser limpiado, el Centro debe proporcionar bidones contenedores específicos para depositar dichos restos. De forma análoga se procede con agujas gastadas, cuchillas o cualquier otro material cortante, que se depositarán en bidones habilitados para este tipo de residuo.
- Ante cualquier otra duda que se le presente al alumno proyectista sobre la gestión y la manipulación de los residuos que produzca durante su estancia en el Centro de Biomateriales, puede consultar al Área de Medioambiente de la UPV, situado en el edificio 8H cuya extensión telefónica es **78956**.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

PRESUPUESTO

Este Trabajo Final de Máster ha sido financiado por el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de València.

En este documento se pretende reflejar el coste que ha sido necesario para llevar a cabo el proyecto. Se calcularán los costes asociados a la mano de obra, a los materiales y a la maquinaria empleada por el estudiante.

En el caso particular de los equipos y maquinaria empleados por el alumno se ha tenido en cuenta la amortización de éstos. Para ello se ha tomado como período de vida útil de éstos 10 años y se ha calculado la amortización en base al número de horas que el alumno proyectista ha usado tales equipos de acuerdo a la ecuación (6).

$$A = \frac{n \cdot C}{N} \quad (6)$$

Siendo:

A: la amortización del equipo en euros

C: el coste del equipo en el momento de su compra en euros

N: tiempo de vida útil

n: tiempo de amortización del equipo por parte del alumno proyectista

Para facilitar la elaboración del presupuesto, se ha tenido en cuenta como coste el cociente entre el coste del equipo y la vida útil, de forma que sólo se deba tener en cuenta el número de horas de uso del equipo para determinar la amortización del equipo que hace el alumno.

Cuadro de mano de obra

A continuación se muestra la parte del presupuesto que es imputable a la mano de obra que ha intervenido en la ejecución del proyecto.

<i>Cuadro de mano de obra</i>				
<i>Nº</i>	<i>Designación</i>	<i>Importe</i>		
		<i>Precio (€)</i>	<i>Cantidad (horas)</i>	<i>Total (€)</i>
1	Personal docente investigador con otras obligaciones en el centro que intervendrá en el planteamiento, gestión, seguimiento y evaluación del proyecto elaborado por el alumno para asegurar la correcta ejecución de éste.	15,000	21,000 hr	315,00
2	Encargado del planteamiento, gestión, seguimiento y evaluación del proyecto a cargo del alumno para la correcta ejecución de éste.	22,000	6,000 hr	132,00
3	Recoge el coste por hora del trabajo de un investigador del CBIT durante la ejecución de alguna de sus actividades para el centro.	0,010	300,007 hr	3,00
4	Técnico del laboratorio del centro investigador a cargo del mantenimiento de los inventarios y equipos, incluyendo en este precio la instrucción que facilite en el manejo y tratamiento de los equipos reactivos y residuos.	12,300	8,500 hr	104,55
			Importe total:	554,55

Cuadro de materiales

A continuación se muestra el coste total asociado a todos los materiales, reactivos y materiales auxiliares que han sido necesarios para la elaboración del proyecto.

Cuadro de materiales				
Nº	Designación	Importe		
		Precio (€)	Cantidad (empleada)	Total (€)
1	Ácido acético glacial grado de pureza para análisis suministrado por la casa comercial <i>Scharlab</i> en formato de 2,5 L de capacidad.	29,400	0,001 L	0,03
2	Ácido ascórbico de pureza superior al 99% facilitado por la casa <i>Sigma-Aldrich</i> . El formato es el de 25 gramos.	1,580	0,400 g	0,63
3	Máscara de gases tipo V de protección de las vías respiratorias con filtros de 0,2 micras de paso y válvula de escape microperforada.	29,500	1,000 ud	29,50
4	Gafas de seguridad de plástico que asegura el recubrimiento total de la zona ocular y ajustable con correa.	2,800	1,001 ud	2,80
5	Bata blanca de seguridad para asegurar la protección al investigador de entrar en contacto con cualquier especie química.	18,760	1,000 ud	18,76
6	Caja de 100 guantes de látex talla M para asegurar la protección de las manos del investigador.	5,150	2,300 ud	11,85
7	Caja de 100 unidades de guantes de nitrilo de talla mediana y color azul para proteger del contacto con especies químicas.	7,000	3,000 ud	21,00
8	Ácido Poliláctico-L modelo <i>INGEO 4024D</i> de la casa comercial <i>NATUREWORKS</i> suministrado en granzas de 2 mm en paquetes de 100 gramos.	1,210	25,790 g	31,21
9	Botella de cloroformo grado de pureza superior para aplicaciones analíticas, estabilizado con etanol proporcionada en formato botella de 1 L y suministrada por la comercial <i>Scharlab</i> .	41,620	0,490 L	20,39
10	Caja reutilizable de puntas de polipropileno con 96 orificios para pipetas. Esterilizable y sellable. El precio incluye, además, el coste de 96 puntas de micropipeta de 200 microlitos de capacidad.	69,000	1,000 ud	69,00
11	Micropipeta de volumen variable entre 20-200 microlitos.	230,000	1,000 ud	230,00
12	Vaso de precipitados de vidrio de 250 ml de capacidad con graduación métrica, borde redondeado y boca en forma de pico.	5,500	2,000 ud	11,20
13	Cubreobjetos fabricados en vidrio soda. Transparente y sin impresiones digitales. Espesor uniforme estándar de 0,13-0,16 mm. Diámetro 12 mm. Caja con tapa superpuesta de 1000 unidades.	0,088	1.650,000 ud	145,20
14	Pinzas de agarre y sujeción de materiales delicados o de accesibilidad difícil.	10700	2,000 ud	3,40
15	Placas Petri de PE de diámetro 8,5 cm.	0,070	9,000 ud	0,63
16	Etanol absoluto para síntesis preparado en bidones de acero de 25 L y suministrados por la casa comercial <i>Scharlab</i> .	5,998	3,000 L	17,99
17	Bote de acetona de 25 L de capacidad proporcionado por la casa comercial <i>Scharlab</i> .	7,997	3,000 L	23,99

Cuadro de materiales				
Nº	Designación	Importe		
		Precio (€)	Cantidad (empleada)	Total (€)
18	Botella de 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Isopropanol con un grado de pureza superior al 99% en el formato de botella de 100 gramos suministrado por la casa comercial <i>sigma-Aldrich</i> .	2,530	210,610 g	532,84
19	Sal hidratada de azometina monosódica suministrada por la casa <i>Sigma-Aldrich</i> en envases de 1 gramo de capacidad.	41,100	0,180 g	7,40
20	Borato sódico decahidratado con pureza superior a 99,5% facilitado por la casa comercial <i>MuleTeam Borax</i> . El producto viene en formato de 500 g.	0,058	10,210 g	0,59
21	Acetato de Potasio de la casa comercial <i>Sigma-Aldrich</i> de pureza superior al 99% y en formato de 500 gramos.	0,285	0,196 g	0,06
			Importe total:	1.178,47

Cuadro de maquinaria

A continuación se muestran los costes asociados a la amortización de los equipos con los que el alumno proyectista ha realizado el TFM.

Cuadro de maquinaria				
Nº	Designación	Importe		
		Precio (€)	Cantidad	Total (€)
1	Balanza analítica modelo AX205, suministrada por <i>METLLER-TOLEDO</i> , incluye los complementos para pesar en inmersión y otros accesorios para determinaciones de densidad.	0,067	20,650 hr	1,38
2	Homogeneizador ultrasónico modelo <i>sonopuls HD3200</i> de la casa comercial <i>BANDELIN</i> con capacidad para volúmenes entre 200 y 1000 mL. 8 puntas de diferentes diámetros disponibles. Frecuencia de las ondas sónicas de hasta 20 kHz con regulación por potencia y temperatura de trabajo, display electrónico, 9 programas de uso y monitorización de usuario.	0,036	2,300 hr	0,08
3	Cabina de insonorización modelo <i>LS4</i> para el homogeneizador ultrasónico con puerta frontal de cristal y capacidad para reducir el nivel de ruidos por debajo de los 10 dB suministrado por la casa comercial <i>LABOLAN, S.L.</i>	0,008	0,300 hr	0,00
4	Bomba volumétrica de jeringa modelo <i>NE-1600</i> suministrada por la casa comercial <i>Syringepump</i> del grupo <i>Pump Systems Inc.</i>	0,007	210,610 hr	1,47

Cuadro de maquinaria

Nº	Designación	Importe		
		Precio (€)	Cantidad	Total (€)
5	TGA/DSC2 suministrado por la casa comercial <i>Mettler-Toledo</i> para la realización de análisis termogravimétricos. Incluye en el precio el software de manejo, el robot automatizado de cambio de muestras, el inyector de gases y el espectrómetro de masas.	1,101	1,417 hr	1,56
6	Variador de frecuencia CFW08 modelo <i>FILTRO FEX1</i> de la casa comercial <i>WEG</i> .	0,003	210,610 hr	0,63
7	Equipo de medida de ángulo de contacto de la casa comercial <i>DATAPHYSICS</i> modelo <i>OCA 15</i> con el set Package 1 de dosificación individual, 14 Kg de peso y dimensiones de 550 x 160 x 365 mm3.	0,291	4,000 hr	1,16
8	<i>Spin coater</i> modelo <i>CEE 200 X</i> , incluye en el precio la bomba de vacío y diferentes boquillas de succión para diferentes substratos.	0,075	8,000 hr	0,60
9	Calorímetro diferencial de Barrido <i>DSC1</i> suministrado por la casa comercial <i>Mettler-Toledo</i> . El precio incluye las cápsulas de medida, el software, la instalación del equipo y los sistemas de inyección de gas refrigerante con sus controladores de presión y temperatura.	0,411	4,500 hr	1,85
10	Microscopio Óptico <i>Nikon Eclipse TS100</i> con lámpara de mercurio para trabajar con fluorescencia a diferentes longitudes de onda, lentes para aumentos de 10, 20, 40 y 60 y software específico de tratamiento de imagen.	0,115	33,000 hr	3,80
11	Motor eléctrico modelo <i>WINES 356</i> suministrado por la casa comercial <i>WEG</i> con un par ofrecido de 1,2 Nm y una velocidad rotatoria máxima de 1.500 rpm.	0,008	210,610 hr	1,60
12	Espectrofotómetro infrarrojo <i>Broker Tensor 27</i> .	0,280	3,000 hr	0,84
13	Dispensador de Agua mili Q modelo <i>Direct Q3</i> para la producción de agua de presencia salina casi nula mediante ósmosis inversa y desionización.	0,043	8,600 hr	0,37
14	Bomba de vacío por impulso por paletas de la casa <i>Vacuubran</i> .	0,590	24,000 hr	14,16
15	Estufa eléctrica modelo <i>Digitronic 2005161</i> de la casa <i>JP-SELECTA</i> , con puerta metálica, capacidad para 145 L y un rango de temperaturas que abarca de 5 a 250°C.	0,090	2,500 hr	0,23
16	Desecador termostático al vacío "Vacuo-Temp" con limitador térmico de temperatura, control electrónico-digital de la temperatura y el tiempo. Campana de vidrio templado y justa de silicona, cuerpo exterior de acero inoxidable AISI 304 y sonda incorporada PT 100.	0,019	30,000 hr	0,57
17	Fuente de alta tensión modelo <i>PS/FC30P04</i> suministrada por la casa comercial <i>Glassman High Voltage Incorporated</i> .	0,034	210,610 hr	7,16
18	Microscopio electrónico de transmisión de 100 kV perteneciente al servicio de Microscopía electrónica asociado al departamento de física aplicada de la UPV.	13,000	5,000 hr	65,00
19	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo ofrecido por el servicio de Microscopía electrónica de la UPV.	25,000	10,000 hr	250,00
			Importe total:	352,54

Cuadro de precios descompuestos

<i>Cuadro de precios descompuestos</i>					
Nº	Código	Ud	Descripción	Total	
1 Fabricación de los soportes materiales basados en PLLA					
1.1.1.1		ud	Se engloban los costes asociados a la limpieza de los cubreobjetos de vidrio. Tiene en cuenta todos los materiales y sustancias químicas empleadas. La unidad de obra se contabiliza como unidad y engloba todas las horas y las cantidades empleadas.		
	M.A.15	2,000 ud	Vaso de precipitados 250 mL	5,600	11,20
	M.A.16	850,000 ud	Cubreobjetos vidrio 12 mm diámetro	0,088	74,80
	M.A.2	1,000 ud	Pinzas	1,700	1,70
	NH-0003	3,000 L	Etanol Absoluto	5,998	17,99
	NH-0039	3,000 L	Acetona	7,997	23,99
	M.7	2,500 hr	Estufa eléctrica	0,090	0,23
	MA.IN	5,000 hr	Investigador	0,010	0,05
	M.10	2,000 hr	Homogeneizador ultrasónico	0,036	0,07
		3,000 %	Costes indirectos	130,030	3,90
Precio total por ud.					133,93
Son CIENTO TREINTA Y TRÉS EUROS CON NOVENTA Y TRÉS CENTIMOS					
1.2.1.2		ud	Costes asociados a la realización de los films de PLLA por la técnica de spincoating así como la preparación de las disoluciones gastadas en esta etapa. Tiene en cuenta los equipos y los materiales gastados. La unidad de obra se contabiliza como unidad y tiene en cuenta todas las horas y las cantidades de sustancias químicas empleadas.		
	M.16	8,000 hr	Spin Coater CEE 200X	0,075	0,60
	M.4	2,000 hr	Bomba de vacío	0,590	1,18
	M.8	2,000 hr	Desecador	0,019	0,04
	M.1	0,450 hr	Balanza Analítica	0,067	0,03
	MA.IN	10,450 hr	Investigador	0,010	0,10
	MA.TL	3,000 hr	Técnico de Laboratorio	12,300	36,90
	MA.CD	2,000 hr	Co-Directora del proyecto	15,000	30,00
	M.A.11	1,000 ud	Micropipeta de 20-200 microlitros	230,000	230,00
	M.A.10	1,000 ud	Caja puntas de micropipeta 200 microlit...	69,000	69,00
	M.A.2	1,000 ud	Pinzas	1,700	1,70
	M.A.16	200,000 ud	Cubreobjetos vidrio 12 mm diámetro	0,088	17,60
	EPI.5	1,000 ud	Guantes de Nitrilo	7,000	7,00
	G-0014	1,000 g	Ácido Poliláctico-L	1,210	1,21
	H-0001	0,050 L	Cloroformo estabilizado con etanol	41,620	2,08
		3,000 %	Costes indirectos	397,440	11,92
Precio total por ud.					409,36
Son CUATROCIENTOS NUEVE EUROS CON TREINTA Y SEIS CÉNTIMOS					

Cuadro de precios descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción		Total
1.3.1.3		ud	Se incluyen los costes asociados a la elaboración de los films por la técnica de Solvent Casting. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge todas las horas y materiales gastados en ella.		
	M.1	1,200 hr	Balanza Analítica	0,067	0,08
	M.10	0,300 hr	Homogeneizador ultrasónico	0,036	0,01
	M.8	6,000 hr	Desecador	0,019	0,11
	MA.IN	10,000 hr	Investigador	0,010	0,10
	EPI.1	1,000 ud	Mascara de gases	29,500	29,50
	EPI.2	1,000 ud	Gafas de seguridad	2,800	2,80
	EPI.3	1,000 ud	Bata de seguridad	18,760	18,76
	EPI.4	0,300 ud	Caja de guantes desechables de látex	5,150	1,55
	G-0014	8,790 g	Ácido Poliláctico-L	1,210	10,64
	H-0001	0,440 L	Cloroformo estabilizado con etanol	41,620	18,31
	S-00002	0,210 g	Borax	0,058	0,01
	M.A.5	9,000 ud	Placas Petri 9 cm	0,070	0,63
		3,000 %	Costes indirectos	82,500	2,48
					84,98

Precio total por ud.

Son **OCHENTA Y CUATRO EUROS CON NOVENTA Y OCHO CÉNTIMOS**

1.4.1.4		ud	Costes asociados a la elaboración de las membranas electrohiladas por la técnica del electrospinning. Incluya la fabricación de las membranas con y sin relleno de solución acuosa, los materiales, equipos y personal necesarios. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge todas las horas empleadas y la cantidad de sustancias químicas gastadas.		
	EPI.4	2,000 ud	Caja de guantes desechables de látex	5,150	10,30
	EPI.5	2,000 ud	Guantes de Nitrilo	7,000	14,00
	S-00002	10,000 g	Borax	0,058	0,58
	G-0014	16,000 g	Ácido Poliláctico-L	1,210	19,36
	R-001	210,610 g	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-isopropanol	2,530	532,84
	M.A.16	600,000 ud	Cubreobjetos vidrio 12 mm diámetro	0,088	52,80
	M.9	210,610 hr	Fuente de alta tensión	0,034	7,16
	M.20	210,610 hr	Motor eléctrico WEG WINES 356	0,008	1,68
	M.19	30,000 hr	Microscopio Óptico Nikon Eclipse TS100	0,115	3,45
	M.14	210,610 hr	Variador de frecuencia motor eléctrico	0,003	0,63
	M.12	210,610 hr	Bomba de jeringa	0,007	1,47
	M.1	13,000 hr	Balanza Analítica	0,067	0,87
	M.22	4,000 hr	Dispensador Agua miliQ	0,043	0,17
	MA.IN	210,610 hr	Investigador	0,010	2,11
		3,000 %	Costes indirectos	647,420	19,42
					666,84

Precio total por ud.

Son **SEISCIENTOS SESENTA Y SEIS EUROS CON OCHENTA Y CUATRO CENTIMOS**

Cuadro de precios descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción		Total
2 Caracterización de los materiales fabricados					
2.1.2.1		ud	En esta unidad de obra se incluyen los costes asociados a la etapa de caracterización microscópica del material. La unidad de obra se define como unidad de obra y tiene en cuenta todas las horas empleadas y los materiales gastados.		
	S-0001	5,000 hr	TEM	13,000	65,00
	S-0006	6,000 hr	FESEM	25,000	150,00
	M.19	3,000 hr	Microscopio Óptico Nikon Eclipse TS100	0,115	0,35
	MA.IN	19,000 hr	Investigador	0,010	0,19
	MA.CD	19,000 hr	Co-Directora del proyecto	15,000	285,00
		3,000 %	Costes indirectos	500,540	15,02
			Precio total por ud.		515,56
			Son QUINIENTOS QUINCE EUROS CON CINCUENTA Y SEIS CÉNTIMOS		
2.2.2.2		ud	En esta unidad de obra se incluyen los costes asociados a la etapa de caracterización físico-química de los materiales. Se tiene en cuenta el coste de los equipos, materiales y reactivos gastados así como el personal participe en esta tarea. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge todas las horas y cantidades de las sustancias empleadas.		
	EPI.4	3,000 hr	Espectrofotómetro Infrarrojo	0,280	0,84
	EPI.5	4,000 hr	Equipo de medida de ángulo de contacto	0,291	1,16
	S-00002	7,000 hr	Investigador	0,010	0,07
	G-0014	3,500 hr	Técnico de Laboratorio	12,300	43,05
	R-001	3,000 %	Costes indirectos	45,120	1,35
			Precio total por ud.		46,47
			Son CUARENTA Y SEIS EUROS CON CUARENTA Y SIETE CÉNTIMOS		
2.3.2.3		ud	En esta unidad de obra se recogen todos los costes asociados a la caracterización térmica del material. Ello incluye maquinaria, reactivos y personal. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge las horas empleadas y los reactivos gastados.		
	MA.TL	2,000 hr	Técnico de Laboratorio	12,300	24,60
	MA.IN	5,947 hr	Investigador	0,010	0,06
	M.18	4,500 hr	DSC METTLER-TOLEDO	0,411	1,85
	M.13	1,417 hr	TGA/DSC2	1,101	1,56
	M.4	2,000 hr	Bomba de vacío	0,590	1,18
	M.8	2,000 hr	Desecador	0,019	0,04
		3,000 %	Costes indirectos	29,290	0,88
			Precio total por ud.		30,17
			Son TREINTA EUROS CON DIECISIETE CÉNTIMOS		

Cuadro de precios descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción		Total
2.4.2.4		ud	Costes asociados al estudio de liberación de las especies bioactivas. Los costes recogen las horas empleadas, el personal partícipe y los reactivos gastados. Se contabiliza la unidad de obra como unidad y recoge en ella todas las horas empleadas y las cantidades de sustancias gastadas.		
	A.O.91	0,400 g	Ácido-L-Ascórbico	1,580	0,63
	A-0016	0,001 L	Ácido acético glacial	29,400	0,03
	RB-206	0,180 g	Azometina	41,100	7,40
	SO-007	0,196 g	Acetato potásico	0,285	0,06
	M.22	0,600 hr	Dispensador Agua miliQ	0,043	0,03
	MA.IN	6,000 hr	Investigador	0,010	0,06
	MA.DP	3,000 hr	Director del proyecto	22,000	66,00
		3,000 %	Costes indirectos	74,210	2,23
			Precio total por ud.		76,44

Son **SETENTA Y SEIS EUROS CON CUARENTA Y CUATRO CÉNTIMOS**

2.5.2.5		ud	Costes asociados al estudio de degradación. Se incluyen todos los costes asociados a los reactivos, maquinaria y personal involucrado. Se contabiliza la unidad de obra como unidad y recoge todas las horas empleadas y las cantidades de materiales gastados.		
	M.22	4,000 hr	Dispensador Agua miliQ	0,043	0,17
	M.1	6,000 hr	Balanza Analítica	0,067	0,40
	M.4	20,000 hr	Bomba de vacío	0,590	11,80
	M.8	20,000 hr	Desecador	0,019	0,38
	S-0006	4,000 hr	FESEM	25,000	100,00
	MA.DP	3,000 hr	Director del proyecto	22,000	66,00
	MA.IN	26,000 hr	Investigador	0,010	0,26
		3,000 %	Costes indirectos	179,010	5,37
			Precio total por ud.		184,38

Son **CIENTO OCHENTA Y CUATRO EUROS CON TREINTA Y OCHO CÉNTIMOS**

Presupuesto y medición

PRESUPUESTO PARCIAL Nº 1 Fabricación de los soportes materiales basados en PLLA

Nº	DESCRIPCIÓN	UDS	LARGO	ANCHO	ALTO	CANTIDAD	Precio (€)	Importe (€)
1.1	Ud. Se engloban los costes asociados a la limpieza de los cubreobjetos de vidrio. Tiene en cuenta todos los materiales y sustancias químicas empleadas. La unidad de obra se contabiliza como unidad y engloba todas las horas y las cantidades empleadas.					1,000	133,93	133,93
1.2	Ud. Costes asociados a la realización de los films de PLLA por la técnica de spincoating así como la preparación de las disoluciones gastadas en esta etapa. Tiene en cuenta los equipos y los materiales gastados. La unidad de obra se contabiliza como unidad y tiene en cuenta todas las horas y las cantidades de sustancias químicas empleadas.					1,000	409,36	409,36
1.3	Ud. Se incluyen los costes asociados a la elaboración de los films por la técnica de Solvent Casting. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge todas las horas y materiales gastados en ella.					1,000	84,98	84,98
1.4	Ud. Costes asociados a la elaboración de las membranas electrohiladas por la técnica del electrospinning. Incluye la fabricación de las membranas con y sin relleno de solución acuosa, los materiales, equipos y personal necesarios. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge todas las horas empleadas y la cantidad de sustancias químicas gastadas.					1,000	666,84	666,84

PRESUPUESTO PARCIAL Nº 2 Caracterización de los materiales fabricados

Nº	DESCRIPCIÓN	UDS	LARGO	ANCHO	ALTO	CANTIDAD	Precio (€)	Importe (€)
2.1	Ud. En esta unidad de obra se incluyen los costes asociados a la etapa de caracterización microscópica del material. La unidad de obra se define como unidad de obra y tiene en cuenta todas las horas empleadas y los materiales gastados.					1,000	515,56	515,56
2.2	Ud. En esta unidad de obra se incluyen los costes asociados a la etapa de caracterización físico-química de los materiales. Se tiene en cuenta el coste de los equipos, materiales y reactivos gastados así como el personal participe en esta tarea. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge todas las horas y cantidades de las sustancias empleadas.					1,000	46,47	46,47
2.3	Ud. En esta unidad de obra se recogen todos los costes asociados a la caracterización térmica del material. Ello incluye maquinaria, reactivos y personal. La unidad de obra se contabiliza como unidad y recoge las horas empleadas y los reactivos gastados.					1,000	30,17	30,17

PRESUPUESTO PARCIAL N° 2 Caracterización de los materiales fabricados

Nº	DESCRIPCIÓN	UDS	LARGO	ANCHO	ALTO	CANTIDAD	Precio (€)	Importe (€)
2.4	Ud. Costes asociados al estudio de liberación de las especies bioactivas. Los costes recogen las horas empleadas, el personal participe y los reactivos gastados. Se contabiliza la unidad de obra como unidad y recoge en ella todas las horas empleadas y las cantidades de sustancias gastadas.					1,000	76,44	76,44
2.5	Ud. Costes asociados al estudio de degradación. Se incluyen todos los costes asociados a los reactivos, maquinaria y personal involucrado. Se contabiliza la unidad de obra como unidad y recoge todas las horas empleadas y las cantidades de materiales gastados					1,000	184,38	184,38

RESUMEN POR CAPÍTULOS

<i>CAPÍTULO FABRICACION DE LOS SOPORTES MATERIALES BASADOS EN PLLA</i>	1.295,11
<i>CAPÍTULO CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES FABRICADOS</i>	853,02
<i>REDONDEO</i>	
<i>PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL</i>	2.148,13

**EL PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL ASECIENDE A LA CANTIDAD DE:
DOS MIL CIENTO CUARENTA Y OCHO EUROS CON TRECE CÉNTIMOS.**

CAPÍTULO	Importe
<i>CAPÍTULO FABRICACION DE LOS SOPORTES MATERIALES BASADOS EN PLLA</i>	1.295,11
<i>CAPÍTULO CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES FABRICADOS</i>	853,02
Presupuesto de ejecución material	2.148,13
0% de gastos generales	0,00
0% de beneficio industrial	0,00
SUMA	2.148,13
21% I.V.A.	451,11
PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA	2.599,24

**EL PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN POR CONTRATA ASECIENDE A LA CANTIDAD DE:
DOS MIL QUINIENTOS NOVENTA Y NUEVE EUROS CON VEINTICUATRO CÉNTIMOS.**