



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA DEL DISEÑO

TRABAJO DE FIN DE
GRADO

***Preparación de soportes celulares cargados con iones bioactivos
basados en biopolímeros degradables para aplicaciones de
ingeniería tisular. Caracterización de sus propiedades
fisicoquímicas.***

*Realizado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de
València*



Alumno: Diego Martínez Folgado

Tutoras: Roser Sabater i Serra
M.^a. Amparo Gámiz González

Septiembre 2017

INDICE

MEMORIA.....	4
1. Objetivo.....	4
2. Motivación	4
3. Antecedentes.....	4
3.1 Ingeniería tisular	4
3.2 Tejido muscular	6
3.3 Biomateriales.....	8
3.4 Ácido poliláctico como biomaterial.....	10
3.5 El Zn ⁺² como ión bioactivo	11
4. Preparación de soportes celulares y técnicas de caracterización.....	13
4.1 Materiales.....	13
4.1.1 Poli-L-Láctico Ácido (PLLA).....	13
4.1.2 Dioxano (C ₄ H ₈ O ₂)	14
4.1.3 Cloruro de Zinc (ZnCl ₂).....	14
4.1.4 Agua (H ₂ O)	15
4.1.5 Zincon (C ₂₀ H ₁₅ N ₄ NaO ₆ S · H ₂ O).....	16
4.2 Métodos.....	17
4.2.1 Preparación de disoluciones.....	17
4.2.2 Obtención de soportes bidimensionales cargados con iones bioactivos.....	20
4.3 Técnicas de Caracterización	21
4.3.1 Propiedades calorimétricas (Calorimetría diferencial de barrido (DSC))	21
4.3.2 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	25
4.3.3 Propiedades mecánicas. Análisis dinámico-mecánico (DMA)	28
4.3.4 Cuantificación de la liberación de iones de zinc por espectrofotometría.....	28
5. Análisis de los resultados.....	35
5.1 Propiedades calorimétricas-Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	35
5.2 Degradación térmica (TGA)	42
5.3 Propiedades dinámico-mecánicas (DMA)	44
5.4 Cuantificación de los iones de zinc por espectrofotometría.....	45
6. Conclusiones	49
7. Glosario de términos	49
8. Bibliografía	50

Pliego de condiciones	53
1. Pliego de condiciones generales.....	53
1.1 Normativa	53
2. Pliego de especificaciones técnicas	58
2.1 Fichas de seguridad de los reactivos	58
2.1.1 PLLA	58
2.1.2 DIOXANO	66
2.2 Especificaciones técnicas de los equipos	76
3. Pliego de prescripciones de gestión de residuos	81
3.1 Gestión de residuos	81
3.1.1 Normas básicas para gestión de residuos no peligrosos	82
3.1.2 Normas básicas para gestión de residuos peligrosos	82
Presupuesto	85
1. Elementos de protección individual	85
2. Reactivos	85
3. Materiales de laboratorio	86
4. Equipos.....	87
5. Mano de obra	87
6. Presupuesto total.....	87

Memoria

1. Objetivo

El objetivo del presente proyecto es la preparación de soportes celulares cargados con iones bioactivos basados en biopolímeros degradables para aplicaciones de ingeniería tisular, concretamente en el ámbito de la regeneración muscular. En particular se han preparado soportes celulares de ácido poliláctico (PLLA) cargados con iones de Zinc (Zn^{+2}) a partir de sales de cloruro de zinc ($ZnCl_2$). Tras la preparación de los materiales, se han caracterizado sus propiedades fisicoquímicas y la dinámica de liberación de iones.

2. Motivación

Este trabajo tiene como principal motivación la realización del Trabajo Final de Grado para la obtención del título de Graduado en Ingeniería Mecánica otorgado por la Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño.

La decisión de realizar dicho proyecto surge de la posibilidad de poder ayudar a la gente con problemas fisiológicos aplicando parte de los conocimientos adquiridos durante la carrera y abrir de esta forma campos nuevos ajenos a la visión tradicional que se tiene sobre la ingeniería mecánica, la cual tuve la oportunidad de desarrollar durante mi formación como ingeniero en una oficina técnica elaborando todo tipo de proyectos de instalaciones.

3. Antecedentes

3.1 Ingeniería tisular

El avance constante en el campo de la medicina nos ha permitido curar enfermedades y reparar daños que hacía unos años se creían irreparables. La ingeniería de tejidos es uno de los campos que más ha evolucionado gracias a tecnologías y materiales que se superan a sí mismo constantemente. Ahora somos capaces de reemplazar tejidos humanos dañados con tejidos fabricados en un laboratorio obteniendo un resultado prácticamente igual al original. Esto nos permite evitar muchos de los inconvenientes que se presentaban antes con los implantes de tejidos, como disponibilidad limitada del tejido, la pérdida de gran parte del mismo, dolores en el sitio de extracción,

pérdida de cualidades, etc. [1]. La ingeniería tisular surge para dar solución a los daños generados tanto en tejidos como en órganos, mediante la utilización de diversos materiales biodegradables y biocompatibles, que aceleren y faciliten el proceso de regeneración (Fig. 1). Esto es posible mediante la fusión de varias disciplinas, como son la ingeniería de materiales, la bioquímica y la fisicoquímica. Para ello es necesario la fabricación de estructuras macroporosas (scaffolds) que sirven como soporte para las células (estas células pueden ser obtenidas del propio paciente), las cuáles se especializarán en función del tejido u órgano que se pretenda regenerar a fin de evitar un rechazo [2].

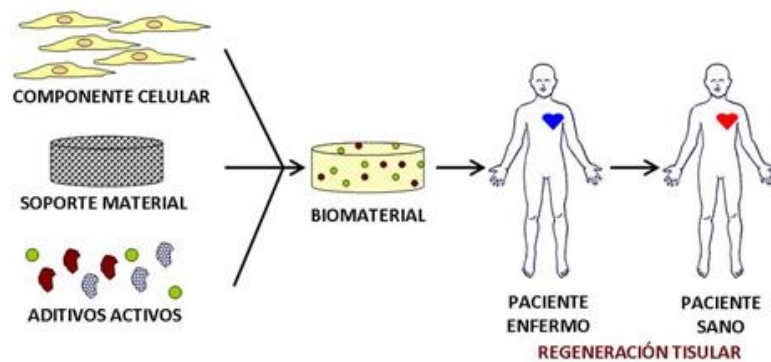


Figura 1. Proceso de regeneración tisular

El campo de la ingeniería de tejidos muestra un enorme potencial para la medicina reparadora, si se puede desarrollar y avanzar hasta el punto de que los tejidos y órganos vivos pueden ser rutinariamente ensamblados y confiablemente integrados en el cuerpo para restaurar, reemplazar o mejorar las funciones de tejidos y órganos (Fig. 2). Por lo tanto, la aplicación de la ingeniería de tejidos a la medicina reparativa muestra una gran promesa para el tratamiento de un gran número de condiciones, incluyendo defectos de nacimiento, trastornos musculoesqueléticos, enfermedades de Alzheimer y Parkinson, diabetes, enfermedades del corazón, hígado e insuficiencia renal y lesiones de la médula espinal. Además de su uso en medicina reparadora, la ingeniería de tejidos podría proporcionar tejidos de sustitución que podrían ser útiles para el descubrimiento y el desarrollo de fármacos y la evaluación toxicológica [3].

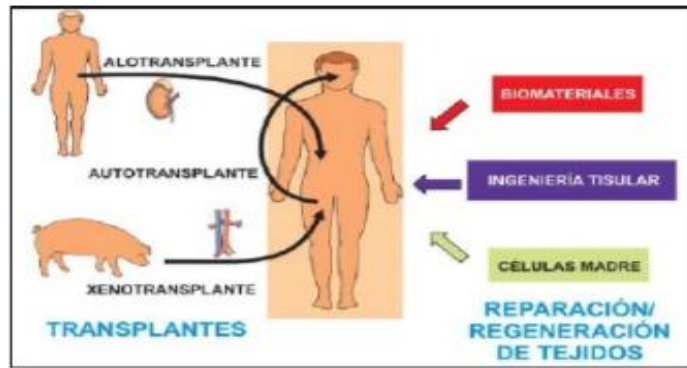


Figura 2. Diferentes aproximaciones para la sustitución de un tejido u órgano dañado

Cuando se desarrollan los nuevos tejidos, la ingeniería tisular trata de simular las condiciones de crecimiento que se darían en condiciones normales. Para ello, las células necesitan desarrollarse alrededor de un soporte o matriz extracelular. Este soporte o matriz extracelular deben cumplir una serie de características que sean adecuadas para el crecimiento de las células, evitándose así las respuestas inmunológicas como rechazos o inflamación. Además, deben de tener un diseño que favorezca el desarrollo y diferenciación celular. Por lo tanto, dependiendo del tejido que se desee regenerar las características materiales y estructurales de la matriz extracelular o soporte varían [4].

3.2 Tejido muscular

La función principal de los músculos es facilitar el movimiento. Esta función se consigue mediante la contracción y estiramiento de los tejidos musculares. El tejido muscular está formado por células contráctiles, denominadas fibras musculares o miofibras, las cuales constituyen el elemento contráctil básico del músculo. Estas células están especializadas en proporcionar un funcionamiento adecuado al músculo a partir de la energía química proveniente de la interacción de las proteínas contráctiles (actina y miosina). El sistema muscular compone aproximadamente el 40% de la masa de los seres humanos permitiéndoles el movimiento.

Las células del tejido muscular son alargadas y multinucleadas (poseen muchos núcleos) y se forman a partir de células mononucleares denominadas mioblastos. Durante el proceso de diferenciación miogénica, los mioblastos se fusionan dando lugar a miotubos (células multinucleadas). La maduración de los miotubos formará finalmente las fibras musculares (Fig. 3).

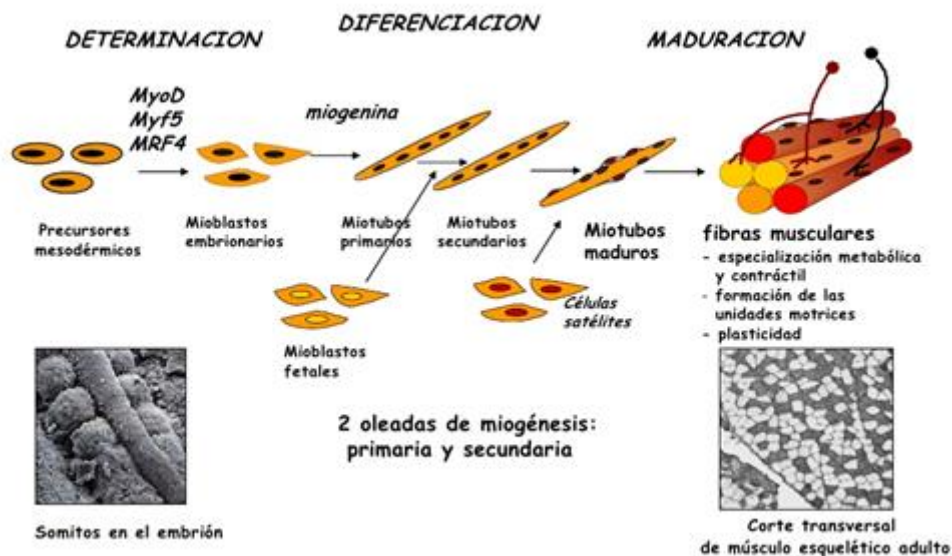


Figura 3. Miogénesis y diversidad muscular

Existen 3 tipos de tejidos musculares que se diferencian por su forma y aspecto (Fig.4):

- **Músculo estriado voluntario o esquelético:** compuesto por células multinucleadas largas y cilíndricas que se contraen permitiendo la movilidad del cuerpo y sus partes. Forma parte de cartílagos o aponeurosis.
- **Músculo cardíaco:** compuesto por células musculares cardíacas o cardiocitos. Son células alargadas y ramificadas. Forman parte de la pared del corazón.
- **Músculo liso involuntario:** compuesto por células mononucleadas con el núcleo en la posición central. Son células fusiformes y no presentan estriaciones ni un sistema de túbulos. Se encuentra en las paredes de las vísceras huecas y en la mayor parte de los vasos sanguíneos.

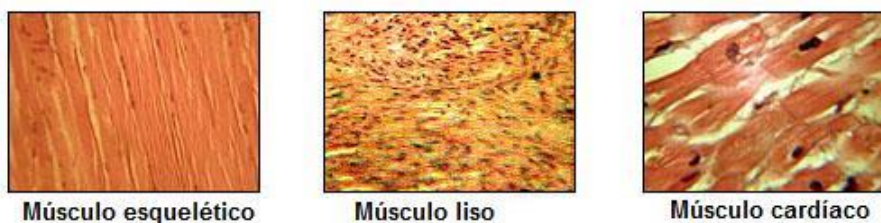


Figura 4: Tipos de tejido muscular

Los accidentes de tráfico, las lesiones deportivas, las heridas de guerra, etc. pueden ocasionar la pérdida de masa muscular que, dependiendo del grupo muscular involucrado, pueden producir como consecuencia diversos grados de disfunción.

El envejecimiento también conlleva una pérdida progresiva de masa muscular. Una degeneración asociada de forma natural al paso de los años pero que, sin embargo, puede producirse de manera acelerada en algunas patologías, caso del cáncer o, sobre todo, en las distrofias musculares [5].

3.3 Biomateriales

Los biomateriales pueden definirse como materiales biológicamente inertes que se implantan con el objeto de reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y sus funciones, lo que implica que están expuestos de modo temporal o permanente a fluidos del cuerpo.

Debido a que los biomateriales restauran funciones de tejidos vivos y órganos en el cuerpo, es esencial entender las relaciones existentes entre sus propiedades y la respuesta biológica tras su implantación (interacción material-célula).

Los biomateriales pueden clasificarse en biodegradables y bioestables. Los materiales biodegradables tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de su implantación dando lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados o metabolizados por el organismo. Los materiales bioestables permanecen de forma indefinida tras su implantación sin degradarse con el paso del tiempo.

Atendiendo al tipo de biomaterial utilizado podemos clasificar los biomateriales en (i) biomateriales de origen biológico y (ii) materiales sintéticos [6].

Los biomateriales de origen biológico son previamente tratados para evitar una respuesta inmunológica y el consecuente rechazo, estos biomateriales proceden del tejido conjuntivo que forma parte de los huesos, los tendones, la piel, los ligamentos y diversas membranas. El biomaterial de esta tipología más usado es el colágeno, se trata de una proteína que puede formar fibras. Sus propiedades mecánicas como la extensibilidad, la formación de agregados moleculares, su elevada fuerza tensil, la retención de agua y la posibilidad de formación de geles, así como sus propiedades químicas como su capacidad para formar enlaces de entrecruzamiento, la reabsorción tisular, la semipermeabilidad, la degradación por colagenasas y la capacidad para interactuar con diversas moléculas hacen del colágeno un excelente biomaterial de origen biológico [7].

Dentro del grupo de los biomateriales sintéticos podemos encontrar (i) los metales, (ii) las cerámicas, (iii) los polímeros (Fig. 5).

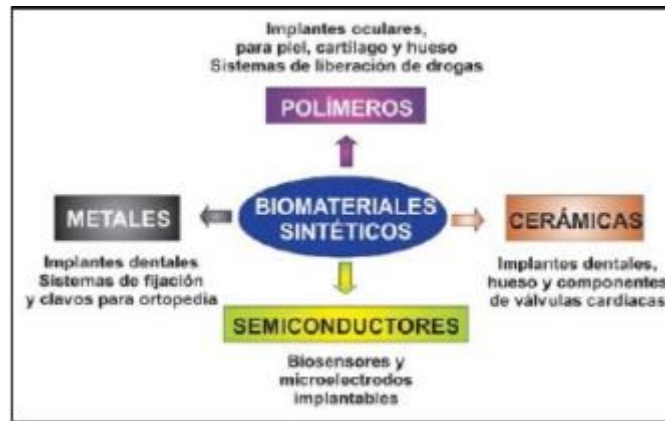


Figura 5. Clasificación de los biomateriales sintéticos en función de su naturaleza química

1.4.1 Los metales son utilizados como biomateriales con dos finalidades (i) la fabricación de prótesis para reemplazar una parte del cuerpo y (ii) implantes para la estabilización y ayuda en el proceso de regeneración de un tejido. Los más utilizados actualmente son diferentes clases de aceros inoxidable, así como titanio y aleaciones de aluminio, vanadio y titanio [8].

1.4.2 Dentro de las cerámicas podemos encontrar dos grupos totalmente diferenciados atendiendo a la funcionalidad de éstas. Por una parte, encontramos (i) los carbonos, cerámicas densas e inertes que se utilizan para la realización de implantes vasculares siendo el más utilizado el grafito. Por otra parte, encontramos (ii) las cerámicas cristalinas bioinertes, las cuáles se utilizan para la realización de implantes dentales debido a su gran resistencia a la corrosión, la buena compatibilidad, y la resistencia mecánica. La más utilizada es la alúmina [9].

1.4.3 Dentro del grupo de los polímeros podemos encontrar dos grupos en función de su finalidad (i) elastómeros y (ii) plásticos. Los elastómeros pueden sufrir grandes deformaciones teniendo la capacidad de volver a su estado original. Los plásticos en cambio poseen una estructura más rígida y pueden subdividirse en función de su comportamiento térmico. También encontramos dentro de los polímeros los hidrogeles los cuáles son muy afines al agua y pueden ser tanto plásticos como elastómeros. La estabilidad química de los polímeros depende de la fuerza que presentan sus enlaces químicos. Las aplicaciones médicas de los polímeros varían en función de las condiciones del mismo, siendo utilizados como suturas (nylon), adhesivos tisulares (cianoacrilatos), transporte y liberación de medicamentos (silicona).

Un biomaterial debe cumplir los requisitos siguientes: (i) biocompatible, debe ser aceptado por el organismo receptor, evitándose así el posible rechazo ante la presencia del biomaterial, (ii) no ser carcinógeno ni tóxico, (iii) tener estabilidad química, o ser biodegradable en productos no tóxicos, durante al menos el tiempo de permanencia en el individuo, (iv) que las propiedades mecánicas, así como la resistencia, el tiempo de fatiga, las características superficiales y el peso sean idóneos, y (v) tanto el tamaño, como el diseño, como la forma del implante, deben ser los apropiados. A esto se le debe añadir una minimización de los costes, un proceso de fabricación reproducible y de fácil procesamiento para su reproducción a gran escala [4].

3.4 Ácido poliláctico como biomaterial

Debido a su bioresorbabilidad y biocompatibilidad en el cuerpo humano, el ácido poliláctico (PLLA), un polímero sintético biodegradable, ha sido empleado para fabricar soportes celulares, membranas de cobertura, diferentes implantes médicos bioabsorbibles, así como en dermatología y cosméticos.

Entre los polímeros biodegradables utilizados más frecuentemente en ingeniería tisular se encuentran los poliésteres alifáticos lineales como es el caso del PLLA. Es de destacar que este biomaterial es uno de los pocos polímeros sintéticos aprobados por *la Food and Drug Administration*, en adelante FDA, para aplicaciones clínicas humanas. Los inconvenientes de este biomaterial residen en su hidrofobicidad, la falta de grupos funcionales (lo que limita la adhesión celular), así como su lenta degradación hidrolítica [10].

Los soportes celulares híbridos, basados en una combinación de polímeros biodegradables sintéticos y naturales, son particularmente prometedores porque combinan las ventajas de los dos tipos de materiales. Deben mantener suficiente resistencia mecánica mientras proporcionan receptores específicos de la superficie celular durante el proceso de remodelación del tejido que estimula tanto el crecimiento celular *in vitro* como *in vivo*. Los materiales híbridos basados en PLLA han sido exitosamente probados clínicamente para ese propósito, se han realizado ensayos sobre tejidos incluyendo hígado, adiposo y tejidos óseos [10].

En conclusión, el PLLA es un material apto en el campo de la ingeniería de los tejidos puesto que proporciona unas condiciones microambientales idóneas para el cultivo y proliferación de células, debido a sus propiedades químicas y físicas. Diversos estudios realizados hasta el momento han constatado la capacidad de este biomaterial, siendo los resultados obtenidos altamente favorables [10].

3.5 El Zn^{+2} como ión bioactivo

Los oligoelementos o elementos traza tienen un papel fundamental en el organismo o presentan una alta toxicidad, es por ello por lo que se encuentran en cantidades inferiores a los 250mg/g tanto en los tejidos que forman nuestro cuerpo, como en los alimentos que ingerimos o los líquidos que bebemos [11]. Son sustancias que actúan como catalizadores de las reacciones bioquímicas del organismo, siendo esenciales para muchos procesos metabólicos. Entre los elementos traza se encuentran el bromo, boro, cobre, hierro, manganeso y zinc. No todos los oligoelementos tienen la misma importancia ni papel dentro del organismo; en nuestro caso nos centraremos únicamente en el papel del zinc como oligoelemento. La mayor parte de las funciones fisiológicas que realiza tienen lugar a nivel intracelular, estando en este compartimento el 95% de éste, repartido por todo el organismo [12]. El mayor contenido se encuentra en huesos, músculos, piel, cabellos, etc. Las concentraciones más elevadas se encuentran en la retina y los genitales masculinos, sobretodo en la próstata. El hígado tiene un rol fundamental en el metabolismo del zinc y es reserva en caso de demanda inminente. La deficiencia de zinc puede producir (i) pubertad retrasada en humanos y un retraso de crecimiento y (ii) alteración de la función inmune que puede llevar a un aumento del número de infecciones tanto digestivas como dermatológicas. Las principales funciones del zinc en el organismo son (i) regulación de la ingesta alimenticia debido a su influencia en el hipotálamo, (ii) influencia sobre la actividad de varias metaloenzimas [13], (iii) papel fundamental en la transcripción génica, (iv) participa en la trasducción de señales como cofactor de la proteína quinasa C [14], (v) influencia de la secreción de GH, IGF-I, hormonas tiroideas y esteroides sexuales [15].

Estas son algunas de las funciones principales del zinc en el organismo, en la tabla siguiente (tabla 1) se pueden observar todas las funciones de éste.

Tabla 1. Funciones fisiológicas del zinc [16]

<i>Funciones fisiológicas del zinc</i>
Función cerebral.
Neuromodulador en las sinapsis.
Respuesta frente al stress.
Crecimiento e integridad celular.
Mantiene la homeostasis de los tejidos epiteliales.
Citoprotector: propiedades antioxidantes, antiapoptóticas y antiinflamatorias.
Metabolismo del hueso pues es un constituyente de la matriz, es un activador de varias metaloenzimas e incrementa los parámetros de la formación del hueso.
Maduración sexual.
Fertilidad y reproducción: importante para el desarrollo y crecimiento fetal.
Mantenimiento de la función ocular normal.
Visión nocturna.
Agente inmunorregulador y regulador en diferentes mediadores de la inmunidad como enzimas y citoquinas, lo que explica la gran importancia del zinc en la regulación de la activación, proliferación y apoptosis de las células linfoides.
Función cardiorrespiratoria y promoción de fuerza en personas sanas y en atletas. Suplementación con zinc tiene efectos positivos en los parámetros hematológicos de atletas.
Determinados elementos traza, como es el caso del Zn, intervienen en la regulación de la presión sanguínea, actuando por lo tanto en ciertos tipos de hipertensión arterial.
Sentido del gusto y del apetito, debido a ello, una terapia con zinc aumenta la recuperación de pacientes que sufren anorexia nerviosa por un incrementar la ganancia de peso y mejorar la ansiedad y depresión de estos pacientes.

El zinc es el menos tóxico de todos los oligoelementos y con un margen de seguridad muy amplio (diferencia entre la dosis recomendada y la tóxica). Según el estudio de la Tolerable Upper Intake Level (UL), que define el nivel máximo de ingesta diaria de un nutriente que no supone un riesgo o que no causa efectos adversos sobre la salud, el UL del zinc se encontraría en 40 mg/día [17]. Se ha demostrado como un consumo de dosis moderadamente elevadas de zinc en hombres genera (i) un aumento en la probabilidad de contraer un cáncer avanzado de próstata, (ii) inhibición de los efectos de los biofosfonatos, (iii) incremento de los niveles de testosterona, (iv) incremento del colesterol, (v) reducción de los niveles de HDL, (vi) puede producir disfunción inmune [18].

4. Preparación de soportes celulares y técnicas de caracterización

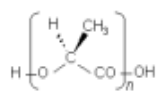
4.1 Materiales

4.1.1 Poli-L-Láctico Ácido (PLLA)

Para la obtención de PLLA, se parte de ácido láctico, el cual puede ser obtenido a partir de la fermentación de recursos renovables como el maíz, la remolacha, el trigo y otros productos con abundancia de almidón [19]. Este polímero ha recibido mucha atención recientemente debido a que es biodegradable y por ello de gran utilidad en aplicaciones médicas. En el presente TFG, se ha utilizado PLLA semicristalino para los soportes celulares disolviéndolo en distintas concentraciones con dioxano.

Puesto que el ácido láctico es una molécula quiral, existe en dos formas, PDLA y PLLA. Es conocido que las propiedades del PLA son altamente influenciadas por el ratio estereo-isomérico L/D, tanto térmica como mecánicamente. De hecho, la configuración con el isómero L es metabolizada por el organismo humano, a diferencia de la configuración con el isómero D. Mezclando la composición se obtienen diferentes niveles de cristalinidad y gracias a eso se puede controlar su biodegradabilidad [20]. El PLLA, en consecuencia, es el compuesto que obtenemos tras la polimerización del ácido L-láctico. Como ya se ha comentado antes, es un polímero semicristalino, con una cristalinidad de alrededor del 37%, termoplástico (similar al polietileno y al polipropileno en algunas de sus propiedades) y totalmente biodegradable. También tiene un elevado módulo de Young (de 2.7 a 16 GPa), por lo que es compatible con aplicaciones en las que se soportan esfuerzos importantes. En cuanto al tiempo que tarda en degradarse, puede estar comprendido entre unas pocas semanas y unos años, según qué tipo de radicales posean sus cadenas y la formulación utilizada [21]. Se utiliza en un amplio número de aplicaciones dada su alta versatilidad y las características que ofrece. Así podemos encontrarlo tanto en aplicaciones de ingeniería tisular (como el caso de este TFG), como en aplicaciones farmacéuticas, prostéticas, en el sector alimentario, etc. A continuación, se presentan (Tabla 2) alguna de sus propiedades de principal interés:

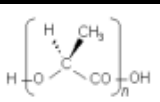
Tabla 2 Propiedades del PLLA

Ácido Poli-L-Láctico (PLLA)	
(C ₃ H ₄ O ₂) _n	
Temperatura de fusión (a 1 atm)	175 - 178 °C
Densidad atómica	14,0067 g/mol
Soluble en	Cloroformo, Dioxano, Dicloretano, Heptano, DMF, Isopropanol, MIBK, Octanol, THF, Tolueno

4.1.2 Dioxano (C₄H₈O₂)

El 1,4-dioxano en condiciones normales es un líquido incoloro y volátil que se disuelve fácilmente en agua. Se puede obtener por deshidratación inter o intramolecular, por dehidrocloración de glicol, diglicol o sus productos clorados de sustitución, o por dimerización de óxido de etileno [22]. Sus aplicaciones más frecuentes son como solvente en la fabricación de productos químicos y como reactivo en el laboratorio. Sus propiedades como solvente lo hacen adecuado para otros muchos usos [23]. En el caso del TFG, se ha utilizado como disolvente para el ácido poli-L-láctico ya que facilita su reacción. A continuación, se presentan en la Tabla 3 algunas de sus propiedades de principal interés:

Tabla 3. Propiedades del dioxano

Dioxano	
C ₄ H ₈ O ₂	
Temperatura de fusión (a 1 atm)	11,8 °C
Densidad atómica	1,03 g/cm ³
Peso molecular	88,11 g/mol

4.1.3 Cloruro de Zinc (ZnCl₂)

El cloruro de zinc es higroscópico y delicuescente por lo que debe protegerse de fuentes de humedad y en condiciones normales presenta polimorfismo. Se conocen cuatro formas cristalinas, llamadas polimorfos. Por enfriamiento rápido de ZnCl₂ fundido se obtiene un vidrio (sólido amorfo). Se utiliza para diversas aplicaciones como (i) procesos textiles, (ii) fabricación de decapantes, (iii) catalizador para síntesis orgánica [24].

Tabla 4. Propiedades del cloruro de zinc

Cloruro de Zinc	
Fórmula molecular	ZnCl ₂
Temperatura de fusión (a 1 atm)	283°C
Densidad atómica	2,907 g/cm ³
Masa molar	136,3 g/mol

4.1.4 Agua (H₂O)

El agua es un compuesto químico inorgánico, inodoro, incompresible, incoloro e insípido, que es fundamental para casi todas las funciones de nuestro organismo, además, es el componente más abundante del mismo [25].

Las moléculas de agua están formadas por dos átomos de hidrogeno y uno de oxígeno que se unen por enlaces covalentes, creando así una molécula altamente estable. Tiene una geometría angular, debido a que el oxígeno es muy electronegativo y atrae hacia él a los electrones de los enlaces covalentes, creando así una polaridad que hace que se pueda unir con facilidad a otras sustancias polares. Entre moléculas de agua, se crean uniones por puente de hidrógeno, los cuáles son muy importantes para la vida, ya que otorgan un amplio rango de propiedades fisicoquímicas al agua.

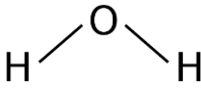
El agua tiene unas importantísimas capacidades como solvente, termorregulador, elemento estructural, etc. Que hacen que sea indispensable en casi todo tipo de medio. En la naturaleza, se puede presentar tanto en estado sólido (hielo o nieve), como líquido (estado al que hace referencia generalmente su nombre) y gaseoso (vapor de agua) [26].

Tiene un alta constante dieléctrica y un calor y de vaporización elevados. También cabe notar que permanece en un amplio rango de temperaturas en fase líquida. Como dato curioso, cabe reseñar que la densidad del agua en estado líquido es superior a su densidad en estado sólido.

En nuestro TFG hemos utilizado concretamente un tipo de agua ultrapura de tipo 1 denominada agua milli-Q. Este tipo de agua es sometida a unos procesos de purificación que implican sucesivas etapas de filtración y desionización. De esta forma se obtiene una pureza convenientemente caracterizada en cuanto a términos de resistividad (típicamente 18,2 MΩ · cm a 25°C) .

A continuación, se presenta en la Tabla 5 algunas de sus propiedades de principal interés:

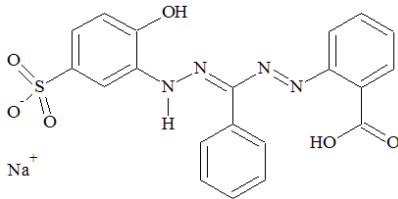
Tabla 5. Propiedades del agua

Agua	
H ₂ O	
Peso molecular	18,015 g/mol
Densidad (líquido) 1 atm	1 g/cm ³
Temperatura de fusión	0°C
Temperatura de ebullición	100°C

4.1.5 Zincon (C₂₀H₁₅N₄NaO₆S · H₂O)

El zincon es una sal monosódica, utilizado como: (i) reactivo para la determinación espectrofotométrica del zinc [27] [28], (ii) determinación simultánea del zinc y cobre [29], (iii) en el análisis automatizado de inyección de flujo de zinc [30].

Tabla 6. Propiedades del zincon

Zincon	
C ₂₀ H ₁₅ N ₄ NaO ₆ S · H ₂ O	
Masa molar	462,41 g/mol
Temperatura de fusión	250°C

4.2 Métodos

4.2.1 Preparación de disoluciones

Materiales

➤ Disolución de PLLA en dioxano al 5%(w/v)

1. PLLA en granza
2. Dioxano
3. Frasco ISO graduado de 50ml de volumen
4. Agitador magnético
5. Imán agitador
6. Balanza digital de precisión

➤ Disolución de $ZnCl_2$ en agua milli-Q partiendo de disolución base

1. Disolución de $ZnCl_2$
2. Agua milli-Q
3. Frasco ISO graduado de 50ml de volumen
4. Agitador magnético
5. Imán agitador
6. Pipeta
7. Probeta graduada de 10ml
8. Tubo de ensayo
9. Vórtex

Los soportes celulares se prepararon a partir de disoluciones de PLLA-dioxano y $ZnCl_2$ en agua. A continuación, se describe el protocolo seguido en la preparación de los soportes celulares bidimensionales.

➤ Disolución de PLLA en dioxano al 5%(w/v)

Se preparó una disolución de PLLA en dioxano al 5% (w/v). El volumen de dioxano utilizado fue de 20ml por lo que mediante un simple cálculo se obtuvo la cantidad de PLLA que nos hacía falta para conseguir la disolución al 5% (w/v):

100 ml de dioxano _____ 5 gramos de PLLA

20 ml de dioxano _____ X gramos de PLLA

$X=20 \cdot 5/100=1$ **gramo de PLLA** necesarios para preparar una disolución al 5%(w/v) en 20 ml de dioxano.

Una vez realizado los cálculos previos, el procedimiento de elaboración de la disolución fue el siguiente:

1. El PLLA en formato granza fue pesado en la balanza digital de precisión, hasta obtener un peso de 1 g.
2. Una vez teníamos pesado el PLLA, se vertió en un frasco ISO graduado de 50ml de volumen 20 ml de dioxano.
3. Se introdujo la cantidad pesada de PLLA en el frasco ISO que contenía el dioxano, se introdujo el imán agitador y se cerró herméticamente con parafilm de forma que se evitara la evaporación del dioxano, ya que se trata de un líquido muy volátil.
4. Se colocó el frasco herméticamente cerrado en un agitador magnético dejándolo agitar durante la noche.

➤ Disolución de $ZnCl_2$ en agua milli-Q partiendo de disolución base

Se partió de una disolución de 400 mg/ml de cloruro de zinc ($ZnCl_2$) en agua que teníamos en stock, nuestro objetivo era preparar 6ml de una concentración de 125 mg/ml, por lo que hubo que hacer el cálculo de volumen que teníamos que coger de la disolución en stock:

$$[A] \cdot V_A = [B] \cdot V_B$$

[A]: concentración de 400 mg/ml

V_A : volumen de la concentración de 400mg/ml requerido

[B]: concentración de 125 mg/ml

V_B : 6 ml de concentración 125 mg/ml

$$V_A = [B] \cdot V_B / [A] = 125 \cdot 6 / 400 = \mathbf{1,875 \text{ ml}}$$
 de disolución de concentración 400 mg/ml

Una vez calculado el volumen necesario de la disolución en stock, calculamos la cantidad de agua milli-Q necesaria hasta llegar a los 6ml de concentración 125 mg/ml que necesitamos, de acuerdo con el siguiente cálculo:

6ml-1,875ml=4,125 ml de agua milli-Q

Una vez realizado los cálculos previos, el procedimiento de elaboración de la disolución fue el siguiente:

1. Se partió de una disolución de cloruro de zinc de concentración 400mg/ml, tal y como se ha indicado anteriormente, de la cual se cogió un volumen de 1,875ml con una pipeta y se depositó en un tubo de ensayo.
2. En el mismo tubo de ensayo y mediante la ayuda de una probeta graduada se añadieron 4,125 ml de agua milli-Q, con el objetivo de obtener una disolución de cloruro de zinc en agua milli-Q con una concentración de 125 mg/ml
3. Posteriormente, se colocó el tubo de ensayo en el vórtex para que se disolviera bien el cloruro de zinc durante aproximadamente 1-2 min.

➤ Preparación de los *films* 1X, 2X, 3X

Con los 6 ml totales de concentración 125 mg/ml preparamos las siguientes disoluciones (ver tabla 7), que son con las que hemos trabajado para la elaboración de los *films*.

Tabla 7. Proporciones en la elaboración de las disoluciones

	Volumen Disolución de concentración 125 mg/ml (ml)	Volumen Agua milli-Q (ml)	Volumen total (ml)
1X	0,078	3,922	4,000
2X	0,156	3,844	4,000
3X	0,234	3,766	4,000

Como podemos observar en la tabla anterior el volumen total utilizado de cada una de las disoluciones fue de 4ml con las proporciones anteriormente citadas. Obteniéndose así un total de 3 disoluciones.

Una vez fueron preparadas las 3 disoluciones, se prepararon 20ml de cada una de las disoluciones mezclando en la siguiente proporción, el 98% de la disolución de PLLA y dioxano preparada anteriormente y el 2% de cada una de las disoluciones de ZnCl₂ (ver tabla 8).

Tabla 8. Cantidad de reactivo utilizado para las disoluciones

	DISOLUCIÓN	PLLA+DIOXANO	ZnCl ₂ 1X	ZnCl ₂ 2X	ZnCl ₂ 3X
1	PLLA+DIOXANO+ZnCl ₂ 1X	19,6ml	0,4ml	-	-
2	PLLA+DIOXANO+ZnCl ₂ 2X	19,6ml	-	0,4ml	-
3	PLLA+DIOXANO+ZnCl ₂ 3X	19,6ml	-	-	0,4ml
4	PLLA+DIOXANO	20,0ml	-	-	-

Todas las mediciones de los volúmenes citados anteriormente se realizaron con una pipeta, siendo estos posteriormente introducidos en frascos ISO graduados.

4.2.2 Obtención de soportes bidimensionales cargados con iones bioactivos

1. Para la elaboración de los *films* y tal y como se ha indicado anteriormente se requería un porcentaje del 2% de cada una de las disoluciones de cloruro de zinc en agua milli-Q, y un 98% de la disolución de PLLA en dioxano, siendo los volúmenes utilizados los citados anteriormente (tabla 8).
2. Estos porcentajes eran tomados de cada una de las respectivas disoluciones con el uso de una pipeta, e introducidos en un frasco graduado ISO, posteriormente, se introdujo el imán agitador y el parafilm para evitar la volatilización del dioxano, dejándose agitar durante la noche en un agitador magnético.
3. Una vez las disoluciones se habían vuelto homogéneas se introdujeron cada una de ellas en placas petri de vidrio mediante el uso de una probeta graduada en la siguiente proporción (tabla 9).

Tabla 9. Relación entre el volumen de disolución y el diámetro de la placa petri

Volumen de disolución (1X, 2X, 3X)	Ø de la placa petri
10,66 ml	6 cm
13,33 ml	7,5 cm
16,00 ml	9cm

4. Una vez se vertió cada una de las disoluciones en las placas petri se dejó bajo campana durante 24h.
5. Posteriormente y, por último, para conseguir la evaporación total del dioxano se realizaron 2 ciclos de vacío de 2 horas a 60°C con un intervalo de descanso de 1 hora entre ciclo y ciclo.

Materiales

1. Placa petri de vidrio
2. Papel de laboratorio
3. Micropipeta
4. Agua milli-Q
5. Disoluciones de ZnCl₂
6. Disolución de PLLA en dioxano
7. Frasco graduado ISO
8. Parafilm
9. Probeta graduada
10. Imán agitador

4.3 Técnicas de Caracterización

4.3.1 Propiedades calorimétricas (Calorimetría diferencial de barrido (DSC))

A la hora de caracterizar el comportamiento térmico de los materiales, la técnica de calorimetría diferencial es una de las más utilizadas. Con esta técnica se mide la capacidad calorífica molar aparente de macromoléculas o cristales en función de la temperatura. La manipulación subsecuente de esta magnitud proporciona una caracterización termodinámica completa de una transición. Fundamentalmente hay tres tipos de información que se pueden obtener de un análisis con el DSC:

1. La capacidad calorífica parcial o absoluta de una molécula.
2. El conjunto de parámetros termodinámicos (cambio de entalpía [ΔH], cambio de entropía [ΔS], y cambio de capacidad calorífica [ΔC_p]) asociados con una transición inducida de temperatura.
3. La función de partición y concomitantemente la población de estados intermedios y sus parámetros termodinámicos.

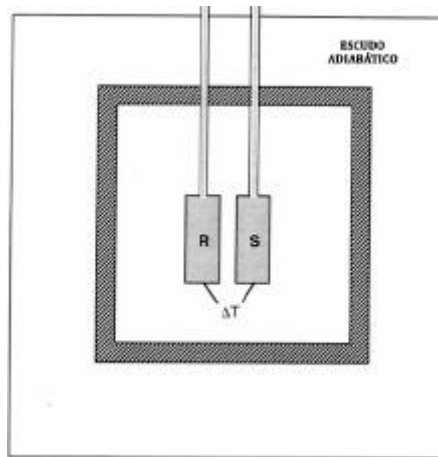


Figura 6. Esquema de un DSC

El funcionamiento del DSC consiste en colocar dos cápsulas al mismo tiempo en dos células distintas (en la Fig. 6, una iría en la R y la otra en la S), una de ellas conteniendo la muestra que se quiere analizar y en la otra una cápsula de control. La diferencia de temperaturas (ΔT) entre la muestra y el control se mantiene igual a cero mientras la temperatura es aumentada o disminuida en un ratio de escaneo constante, gracias a un mecanismo de retroalimentación. La potencia diferencial que tiene que ser aplicada a la célula con la muestra para mantener $\Delta T = 0$ se monitorea continuamente en función de la temperatura. Esta potencia diferencial es directamente proporcional a la capacidad calorífica entre las células y constituye la cantidad básica medida por el aparato [31].

Una vez obtenidos los resultados, se puede restar el control a la muestra, obteniendo así la representación termográfica característica del material que se quiere analizar. Gracias a la gráfica, se pueden determinar distintos comportamientos en la muestra, según sea su estructura interna y sus características térmicas (Fig. 7).

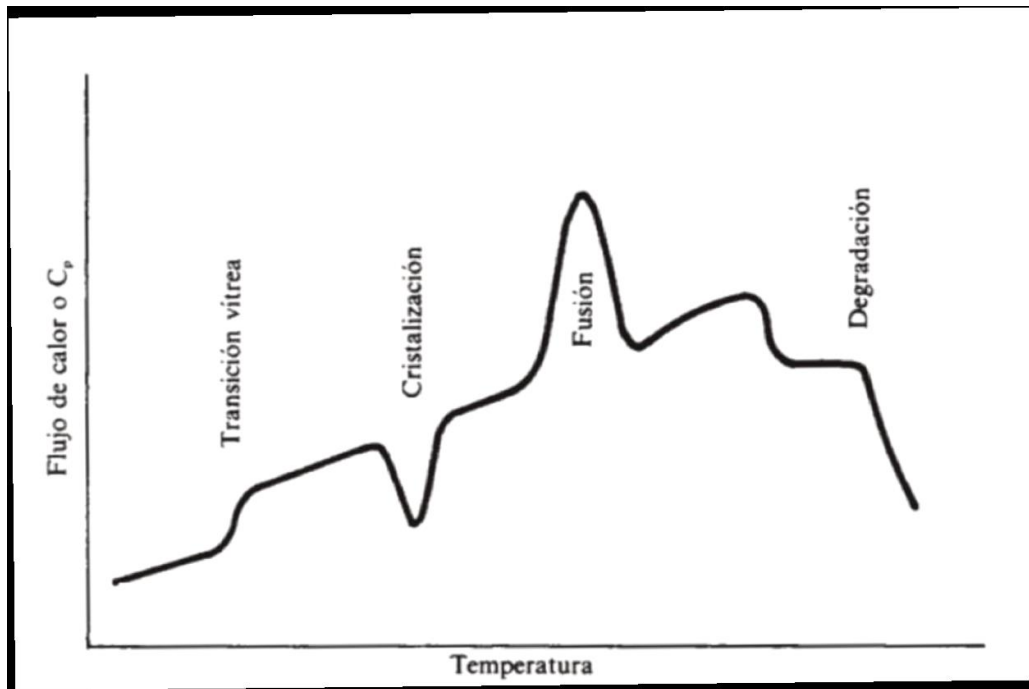


Figura 7. Transiciones típicas mostradas en un análisis DSC

Transición Vítrea

La transición vítrea es el momento en el que un polímero pasa de tener una cierta capacidad calorífica a ver como esta es aumentada después del punto de inflexión (T_g).

Fase de cristalización fría

Después de la transición vítrea, algunas veces los polímeros ganan la suficiente energía como para formar nuevos cristales, produciéndose una liberación de calor. Esta liberación de calor se traduce en una depresión en la curva de flujo de calor vs temperatura.

Fase de fusión

Cuando se alcanza la temperatura de fusión (T_m), se produce la ruptura de todos los enlaces cristalinos. Es por ello por lo que se necesita un gran aporte de calor, que se ve reflejado como el gran pico del final de la gráfica. El área de la curva de dicho pico representa ese aporte de calor, dándonos la entalpia del proceso de fusión.

Para cada material y/o análisis se preconfiguran unas condiciones para la medida, de manera y forma que se pueden controlar las condiciones en las que se realizará el ensayo.

En el caso del proyecto que aquí se detalla, se utilizó un **Perkin Elmer - DSC 8000** (Fig. 8), configurándolo para realizar dos ciclos de calentamiento y uno de enfriamiento. El programa para dicho ciclo (el cual tardaba alrededor de 50 min en completarse) era:

1. Enfriar desde 30°C hasta 0°C a 20 °C/min.
2. Mantener durante 5 min a 0°C
3. Calentar desde los 0°C hasta los 180°C a 20°C/min.
4. Mantener durante 10 min a 180°C
5. Enfriar desde 180°C hasta 0°C a 20°C/min.
6. Mantener durante 5 min a 0°C
7. Calentar desde los 0°C hasta los 180°C a 20°C/min.

Se hizo el ensayo con 5 muestras diferentes:

- PLLA 5%+ Dioxano+ ZnCl₂ 1X
- PLLA 5%+ Dioxano+ ZnCl₂ 2X
- PLLA 5%+ Dioxano+ ZnCl₂ 3X
- PLLA 5%+Dioxano
- PLLA en granza(puro)

Las muestras tenían que tener un peso entre 5-6 mg. Una vez introducidas y selladas dentro de las cápsulas para introducirlas en el DSC, se les hacía un pequeño agujero con una aguja para así evitar que si quedaba algún resto de solvente o habían absorbido agua explotasen con la presión del vapor durante la evaporación del solvente (o el agua) al aumentar la temperatura.



Figura 8. Equipo DSC

4.3.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría es una técnica que consiste en medir el peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras se le aplica un programa controlado de temperatura en una atmósfera específica.

Dicho programa puede consistir tanto en mantener la temperatura constante (isoterma), como en calentar a velocidad constante, enfriar o alguna combinación de las anteriores. En general, lo que se obtiene es una pérdida de peso debido a la degradación de la muestra (por varios motivos, como descomposición, sublimación, desorción, absorción, etc.), aunque en algunos casos concretos también se puede dar una ganancia de peso. La atmósfera que se utiliza puede ser de dos tipos: estática y dinámica (con un caudal determinado). Los gases más habituales que se utilizan son el N₂, aire, Ar y CO₂.

La termogravimetría se diferencia de otros procesos térmicos como el DSC en que es capaz de detectar procesos en los que existe una variación de peso, sin embargo, no detecta procesos como fusiones y cambios de fase.

El equipo que se ha utilizado para el análisis TGA consta de 5 partes principales (la Figura 9 muestra el equipo utilizado en el presente TFG (**Mettler Toledo - DSC/TGA 2**):

1. Microbalanza electrónica (y su correspondiente equipo de control)
2. Horno y sensores de temperatura (que suele ser un termopar cerca de la muestra)
3. Programador de temperatura
4. Controlador de la atmósfera (según el gas y el caudal)
5. Dispositivo para almacenar y en algunos casos procesar los datos de peso y temperatura obtenidos de la prueba



Figura 9. Equipo de TGA

También hay que tener en cuenta los pequeños crisoles en los que se introducen las muestras, pues son piezas fundamentales y suelen ser costosas, ya que por mucho que parezcan simples contenedores desechables, los de buena calidad están fabricados con platino (aunque también se utilizan de aluminio o alúmina en algunos casos).

Los resultados del TGA se representan en gráficas denominadas termogramas o curvas termogravimétricas. En ellas se representa el peso en el eje Y (que puede venir dado en valor absoluto o en porcentaje para hacer comparaciones) frente a la temperatura o al tiempo en el eje X. Habitualmente, también se suele solapar en el mismo gráfico la curva correspondiente a la derivada respecto al tiempo o a la temperatura de la curva termogravimétrica (Fig. 10). Esta curva representa la velocidad de pérdida o ganancia de peso. Gracias a ella, se pueden vislumbrar con más claridad picos de temperatura, así como la temperatura inicial y final de los procesos, al igual que ayuda a detectar procesos solapados [32].

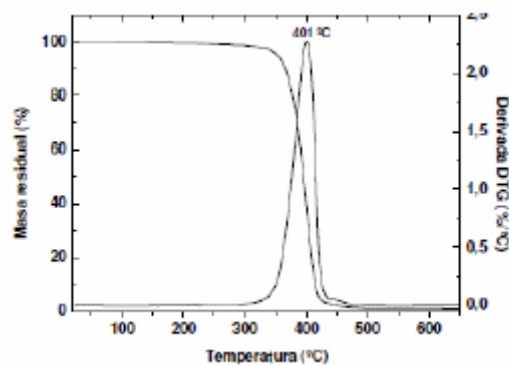


Figura 10. Termograma de un polímero con su derivada

Se pueden obtener diferentes tipos de información de una gráfica como la anterior (figura 10). Según el momento y la temperatura a la que se produce un cambio en la masa, se pueden establecer ciertos patrones que nos indican que es lo que ha

provocado dicho cambio. Estas son los procesos que pueden presentarse, especialmente en los polímeros, en orden de menor a menor temperatura de aparición:

- Desprendimiento de sustancias volátiles: Cuando hay una pérdida de masa a una temperatura relativamente baja, se suele deber a que se desprenden las sustancias volátiles, agua, monómeros sin reaccionar, productos gaseosos de la descomposición de un material, etc.
- Inicio del proceso de degradación del material polimérico: Se observa la pérdida de masa más grande de todo el proceso, que suele venir dada por la degradación térmica del propio polímero incluso en atmósfera inerte.
- Combustión de la fracción orgánica: El residuo que resulta después de la fase anterior está compuesto por material de naturaleza orgánica que en atmósfera oxidante experimenta un proceso de combustión.
- Presencia de cargas de naturaleza inorgánica. Las cargas de naturaleza inorgánica también quedan como residuos después del proceso de degradación del polímero, dado que, por lo general, degradan a temperaturas más altas.

En el caso del TFG, el programa que se siguió para el tratamiento de las muestras fue el siguiente:

- Pesado previo de las muestras a la introducción en el equipo para establecer un peso de entre 5-10 mg.
- Pesado de muestras dentro del propio equipo, habiendo quemado primero los crisoles que contendrían la muestra con un soplete (para eliminar la carbonilla residual), para después tarar su peso e introducir las muestras.
- Calentamiento desde 30°C hasta 85°C a una velocidad de 10°C/min.

Se colocaron en los crisoles 5 muestras: (i) PLLA puro en granza, (ii) PLLA+DIOXANO, (iii) PLLA+DIOXANO+ZnCl₂ 1X, (iv) PLLA+DIOXANO+ZnCl₂ 2X, (v) PLLA+DIOXANO+ZnCl₂ 3X.

4.3.3 Propiedades mecánicas. Análisis dinámico-mecánico (DMA)

Para caracterizar mecánicamente los soportes celulares se optó por someterlos a esfuerzos de tracción a través de un análisis dinámico-mecánico (DMA).

El comportamiento mecánico de los polímeros y compuestos poliméricos se estudia comúnmente por DMA, una técnica en la que el módulo de almacenamiento (E') y el módulo de pérdida (E'') de la muestra, bajo carga oscilante, son controlados con el tiempo, la temperatura o la frecuencia de oscilación de la fuerza aplicada. La relación E''/E' es la tangente de pérdidas ($\tan \delta$). Los módulos cambiarán con la temperatura a medida que cambien los movimientos moleculares dentro del polímero. El módulo de almacenamiento de un polímero disminuye rápidamente mientras que el módulo de pérdida y $\tan \delta$ pasa a través de un máximo cuando el polímero se calienta a través de la región de transición vítrea [33].

En el presente TFG se realizó un barrido en frecuencia de dos de los *films* preparados (film preparado a partir de la disolución de PLLA y dioxano en cloruro de zinc 1X y PLLA con dioxano en cloruro de zinc 3X) desde 0,01Hz hasta 100Hz manteniendo la temperatura constante a 37°C puesto que se trata de la temperatura corporal del ser humano, y la finalidad del ensayo es probarlo en condiciones reales. De cada uno de los *films* se realizaron 5 medidas.

4.3.4 Cuantificación de la liberación de iones de zinc por espectrofotometría

Materiales

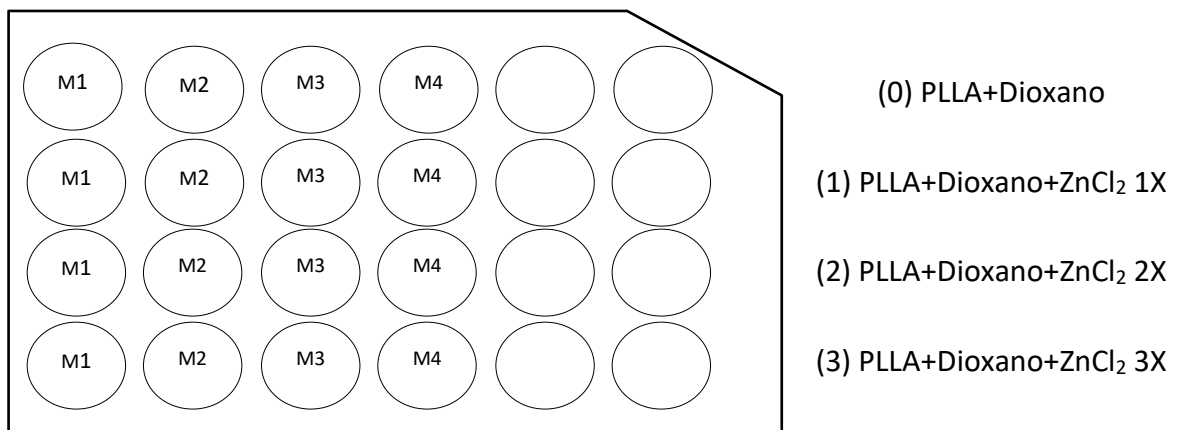
1. Troquel $\varnothing 8\text{mm}$
2. Martillo
3. Placa multipocillo (P24)
4. Tubos eppendorf
5. Micropipeta
6. Gradilla
7. Tubo de plástico
8. Zincon
9. Balanza electrónica
10. Placa multipocillo (P96)
11. NaOH
12. Buffer tris

- 13. Víctor
- 14. Vortex

➤ Preparación de la alícuotas

1. Se troquelaron 4 muestras de diámetro 8mm de cada uno de los *films* realizados previamente: (i) PLLA+Dioxano, (ii) PLLA+Dioxano+ZnCl₂ 1X, (iii) PLLA+Dioxano+ZnCl₂ 2X, (iv) PLLA+Dioxano+ZnCl₂ 3X.
2. Las muestras troqueladas fueron introducidas en una placa multipocillo (P24) (tabla 10). Posteriormente se introdujo en cada uno de los pocillos 1ml de agua milli-Q.

Tabla 10. Distribución de cada una de las muestras en la placa multipocillo P24



Se realizaron 12 medidas de tiempo acumulativas:

- | | | |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| t ₁ : 10min | t ₅ : 50min | t ₉ : 150min |
| t ₂ : 20min | t ₆ : 60min | t ₁₀ : 240min |
| t ₃ : 30min | t ₇ : 90min | t ₁₁ : 24h |
| t ₄ : 40min | t ₈ : 120min | t ₁₂ : 72h |

En cada medida de tiempo se obtuvieron 16 alícuotas distintas. Obteniéndose un total de 192 alícuotas.

3. Las alícuotas fueron realizadas con una micropipeta y se introdujeron en tubos eppendorf, los cuales fueron etiquetados de la siguiente manera:

1º Tipo de disolución ((0), (1), (2), (3))

2º Numero de muestra (M1, M2, M3, M4)

3º Medida de tiempo (t1, t2, t3, ..., t12)

4. Cada eppendorf contenía 60µl de cada una de las respectivas alícuotas tomadas y se iban depositando en una gradilla ordenados por la medida de tiempo.

➤ Preparación de las disoluciones patrón para la curva de calibrado a partir de la disolución de ZnCl₂ en agua milli-Q de concentración 125 mg/ml.

1. Se determinaron cantidades en 8 puntos diferentes para poder elaborar la curva de calibrado.

$$[\text{ZnCl}_2] = 125 \text{ mg/ml} = 125 \text{ g/L}$$

$$\text{PM}(\text{ZnCl}_2) = 136,29 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{ZnCl}_2) = [\text{ZnCl}_2]/\text{PM}(\text{ZnCl}_2) = 125/136,29 = 0,917\text{M} = 9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M}$$

Como la cantidad era muy pequeña se decidió diluirlas en agua para poder pipetear correctamente. Se diluyó 1ml de ZnCl₂ en 9ml de agua mili-Q obteniéndose una disolución 1:10.

Punto 1- 500 µM

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V_1 = 500 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 0,55 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,55 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{5,5 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 5,5 = \underline{994,5 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

Punto 2- 400 μM

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V1 = 400 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 0,44 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,44 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{4,4 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 4,4 = \underline{995,6 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

Punto 3- 250 μM

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V1 = 250 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 0,27 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,27 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{2,7 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 2,7 = \underline{997,3 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

Punto 4- 125 μM

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V1 = 125 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 0,136 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,136 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{1,36 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 1,36 = \underline{998,64 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

Punto 5- 62,5 μM

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V1 = 62,5 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 0,068 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,068 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{0,68 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 0,68 = \underline{999,32 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

Punto 6- 31,25 μM

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V1 = 31,25 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 0,034 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,034 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{0,34 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 0,34 = \underline{999,66 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

Punto 7- 15,625 μM

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V1 = 15,625 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 0,017 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,017 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{0,17 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 0,17 = \underline{999,83 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

Punto 8- 7,8125 μM

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$9,17 \cdot 10^5 \mu\text{M} \cdot V1 = 7,8125 \mu\text{M} \cdot 1000 \mu\text{l}$$

$$V1 = 0,008 \mu\text{l de ZnCl}_2$$

Como se hizo la dilución $0,008 \mu\text{l} \cdot 10 = \underline{0,08 \mu\text{l de ZnCl}_2}$

$$1000 - 0,08 = \underline{999,92 \mu\text{l de agua milli-Q}}$$

2. Se pipetearon las cantidades en tubos eppendorf correctamente señalados.

➤ Preparación de la disolución de NaOH 1M.

1. Se determinaron las cantidades necesarias:

Volumen total de la disolución= 10ml= 0,01L

PM NaOH= 23+16+1= 40g/mol

$M = n / v \text{ (L)} \Rightarrow n = 1 \cdot 0,01 = 0,01 \text{ moles de NaOH}$

$n = m / PM \Rightarrow m = PM \cdot n = 40 \cdot 0,01 = 0,4 \text{ g de NaOH}$

2. Se pesaron 0,4g NaOH en la balanza electrónica y fueron añadidos a un frasco graduado ISO.
3. Se midieron 10 ml de agua milli-Q con una probeta y fueron añadidos al mismo frasco graduado ISO.
4. Se introdujo el imán agitador y se dejó agitar durante 30min en un agitador magnético.

➤ Preparación de la disolución de zincon.

1. Se pesaron 9,7mg de zincon introducidos en un tubo de plástico en la balanza electrónica.
2. Se añadieron mediante el uso de una micropipeta 146µl de la disolución de NaOH preparada anteriormente en el tubo de plástico que contenía el zincon.
3. Se añadieron mediante el uso de una probeta graduada y una micropipeta 7,3ml de Buffer tris (7ml con la probeta y 300µl con la micropipeta) en el tubo de plástico que contenía el zincon y el NaOH.
4. Finalmente se mezcló todo con el vortex durante 2-3min y posteriormente se tapó con papel de aluminio.

- Colorimetría (Liberación de iones de zinc Zn^{+2}).
1. Se cogieron 3 placas multipocillo (P96) para la realización del ensayo de liberación de iones de zinc Zn^{+2} . El número total de alícuotas fue de 224 (48 de cada una de las disoluciones y 32 de la curva de calibrado).
 2. En cada uno de los pocillos se introdujeron las siguientes cantidades y en este orden:
 - 1º) 50µl de disolución
 - 2º) 75µl de buffer tris
 - 3º) 25µl de zincon
 3. Se esperó durante 2min y posteriormente fue analizado con el Víctor.

5. Análisis de los resultados

5.1 Propiedades calorimétricas-Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Con la técnica de calorimetría diferencial de barrido se han podido analizar los diferentes fenómenos que se producen durante un programa térmico en el PLLA utilizado en el proyecto.

➤ Primer calentamiento

Para empezar el análisis de los resultados de la técnica del DSC, se observa la gráfica de representación de la curva de flujo de calor (Fig. 11) durante el primer calentamiento (de 0 a 180 °C), así como la derivada de la misma (Fig. 12).

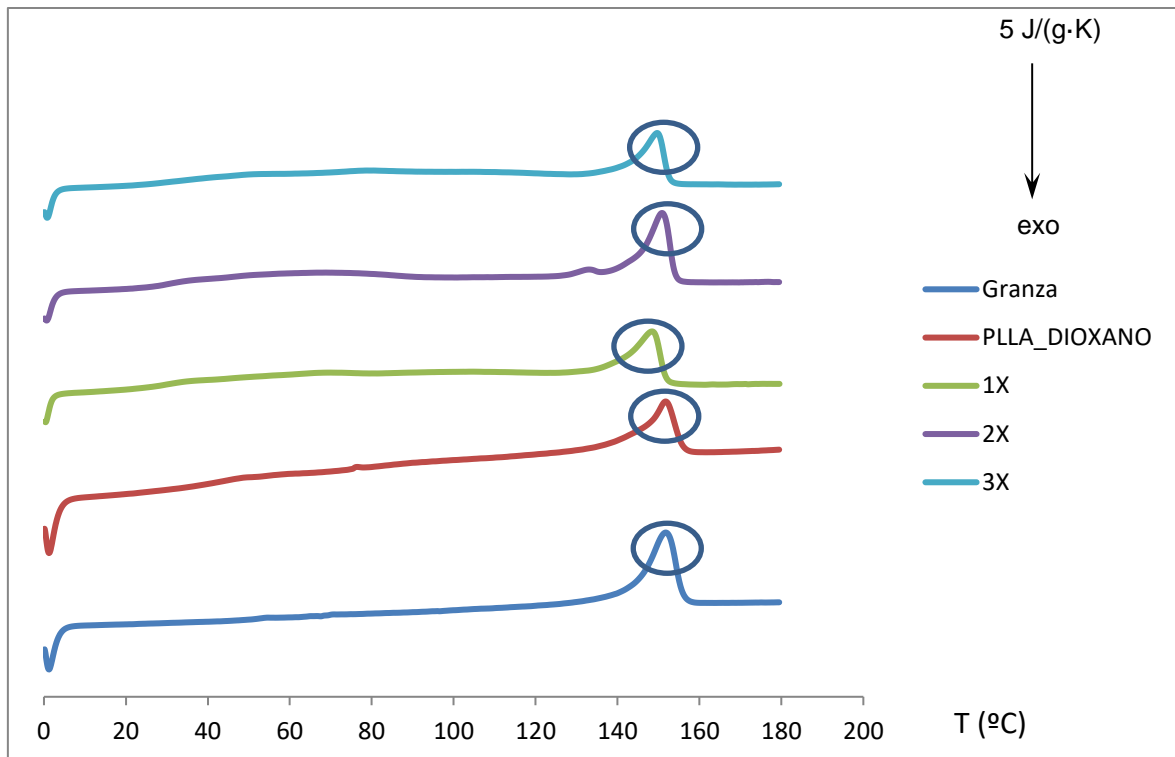


Figura 11. Gráfico DSC del primer calentamiento de diferentes estructuras de PLLA

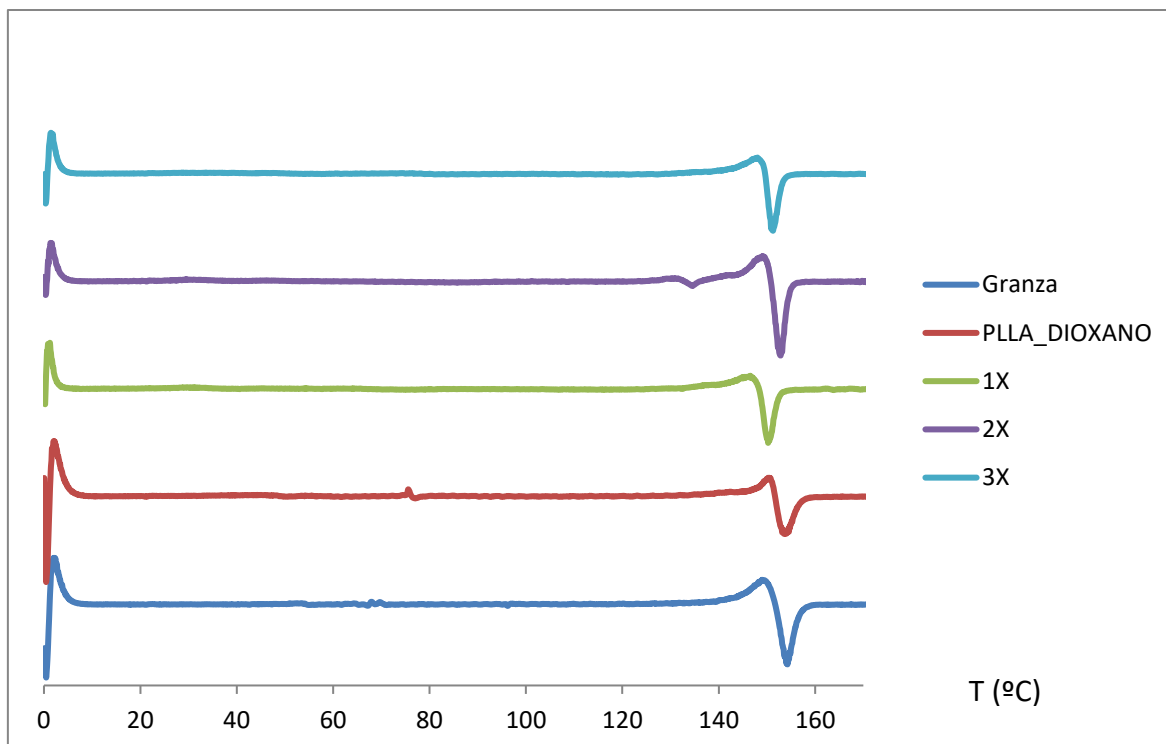


Figura 12. Gráfico DSC de la derivada del primer calentamiento de diferentes estructuras de PLLA

En nuestras gráficas se puede observar claramente cinco diferentes estructuras que contienen PLLA: (i) PLLA en granza (puro), (ii) PLLA con dioxano, (iii) PLLA con dioxano y con una cantidad de sal de cloruro de zinc (1X), (iv) PLLA con dioxano y con una cantidad de sal de cloruro de zinc (2X), (v) PLLA con dioxano y con una cantidad de sal de cloruro de zinc (3X).

En la primera gráfica (Figura 11) y rodeado con un círculo de color azul oscuro, se puede apreciar la fusión de los cristales de PLLA. Los cuales funden a una temperatura entre 145°C y 155°C. En cambio, la temperatura de transición vítrea no es claramente observable ni en la gráfica del flujo de calor durante el primer calentamiento (Figura 11) ni en su derivada (Figura 12), por lo que se procedió a su cálculo utilizando el software del DSC del laboratorio, obteniéndose los resultados observables en la tabla 11.

Para el cálculo del porcentaje de cristalinidad se partió de que la entalpía para un enantiómero puro de PLA 100% cristalino (ΔH_m^0) es de 93 J/g [34], dividiendo cada uno de los ΔH obtenidos en el software del DSC para cada una de las distintas estructuras con PLLA entre el ΔH del PLLA 100% cristalino se obtuvo el porcentaje de cristalinidad.

Tabla 11. Propiedades de cada una de las estructuras que contienen PLLA durante el primer calentamiento.

	Tm (°C)	Tm (K)	Tg (°C) _{inflex point}	ΔH (J/g)	cristalinidad (%)
PLLA Granza	151,78	424,93	62,83	28,06	30,17
PLLA+Dioxano	151,85	425,00	62,94	19,5	20,97
Disolución 1X	148,54	421,69	60,12	16,67	17,92
Disolución 2X	151,05	424,20	52,98	21,94	23,59
Disolución 3X	149,75	422,90	60,81	18,2	19,57

En la tabla precedente (tabla 11) es reseñable que el hecho de introducir sales no ha afectado al porcentaje de cristalinidad, ya que las cantidades eran muy pequeñas y estaban muy dispersas en la muestra, lo que ha ocasionado una incapacidad de actuación en el núcleo de cristalización. Por tanto, y como consecuencia de ello, el más cristalino es el PLLA en granza, debido al procesado al que se ha visto sometido.

➤ Primer enfriamiento

Como continuación del análisis de los resultados de la técnica del DSC, se observa la gráfica de representación de la curva de flujo de calor durante el primer enfriamiento, realizado tras el tratamiento térmico indicado en el punto anterior (Fig. 13), así como la derivada de la misma (Fig. 14).

Después del primer calentamiento se han fundido todas las muestras, por tanto, se ha borrado la historia térmica asociada al proceso, esta etapa, así como las sucesivas, nos han servido para observar el comportamiento de las muestras después del borrado de la historia térmica.

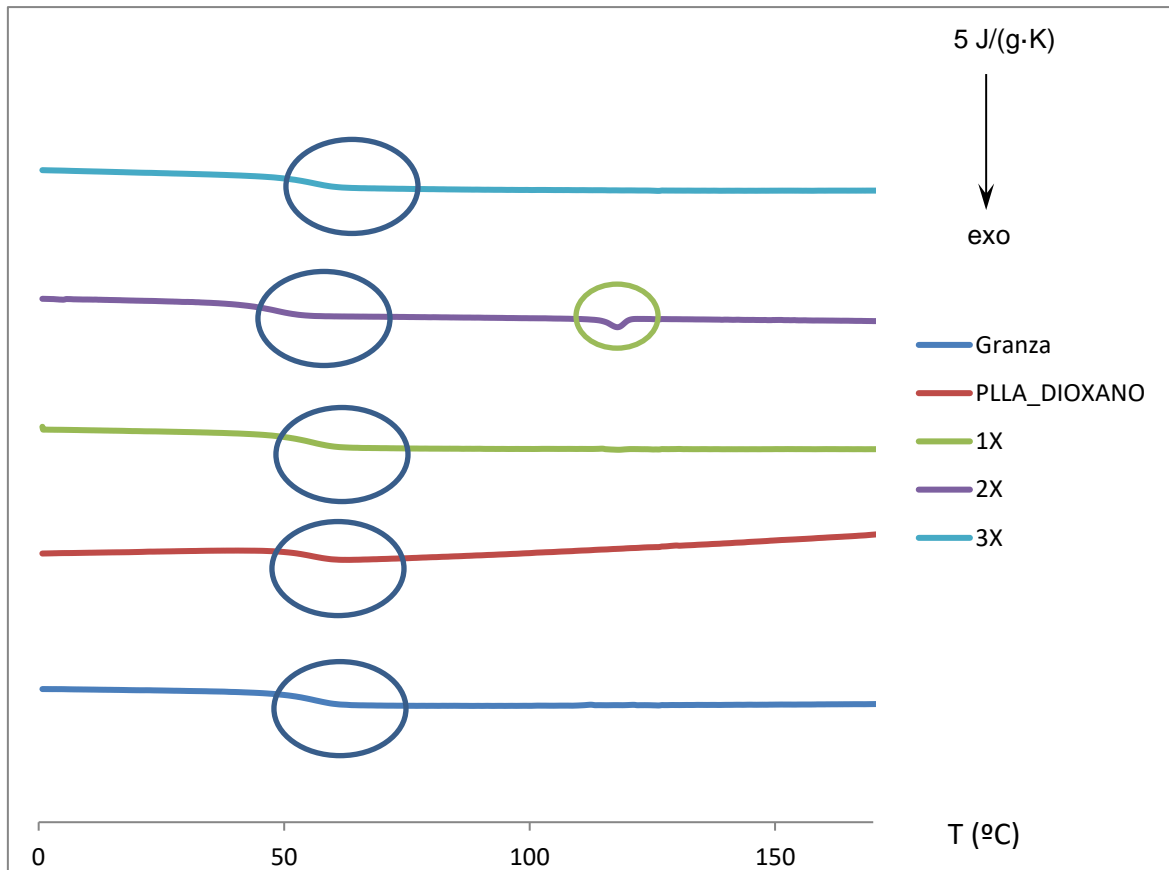


Figura 13. Gráfico DSC del primer enfriamiento de diferentes estructuras de PLLA

En la gráfica anterior (figura 13) se pueden observar los distintos valores de la Tg durante este proceso (señalizados con un círculo azul), para obtener el valor de la misma se calcula la derivada, donde este punto de inflexión se ve representado en la gráfica de la derivada (figurar 14) como un mínimo. También se puede observar como la estructura de PLLA 2X presenta un pequeño pico a una temperatura de 116,55°C (señalizado con un círculo verde), este valor representa una pequeña cristalización durante el enfriamiento, si bien es cierto que esta cristalización es ínfima y apenas relevante. El resto de muestras no ha sufrido cristalización, esto es debido a que la velocidad era muy rápida (20°C/min) para que hubiera una formación de cristales durante el enfriamiento.

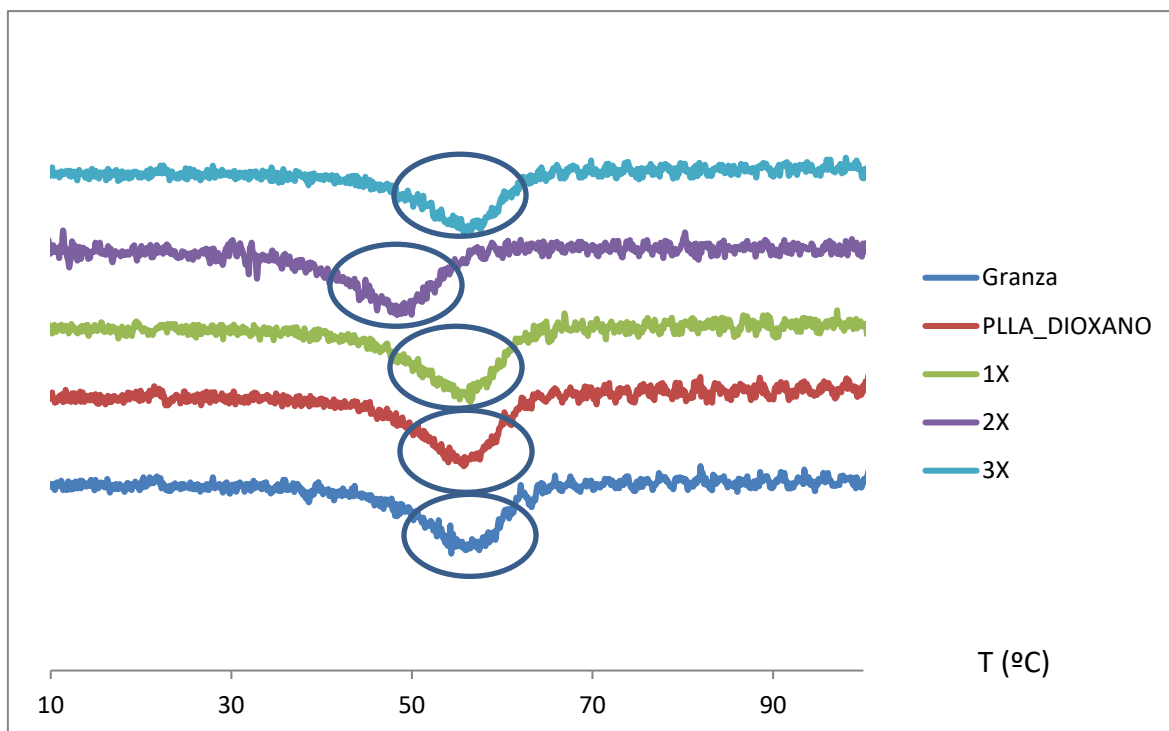


Figura 14. Gráfico DSC de la derivada del primer enfriamiento de diferentes estructuras de PLLA

En la figura 14 se puede observar claramente la transición vítrea (señalados con un círculo azul), los valores obtenidos son recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 12. Propiedades de cada una de las estructuras que contienen PLLA durante el primer enfriamiento.

	T_g (°C) _{inflex point}
PLLA Granza	56,36
PLLA+Dioxano	55,75
Disolución 1X	56,49
Disolución 2X	49,95
Disolución 3X	55,75

Como se puede observar en la tabla anterior (tabla 12) la temperatura de transición vítrea obtenida durante el primer enfriamiento está comprendida entre 3°C-8°C por debajo de la obtenida durante el primer calentamiento. Esto se debe a que el tratamiento térmico aplicado (en este caso un aumento o decremento de temperatura debido al calentamiento o enfriamiento) influye en la temperatura de la T_g , con valores ligeramente distintos, aunque siempre dentro del mismo intervalo de temperatura.

➤ Segundo calentamiento

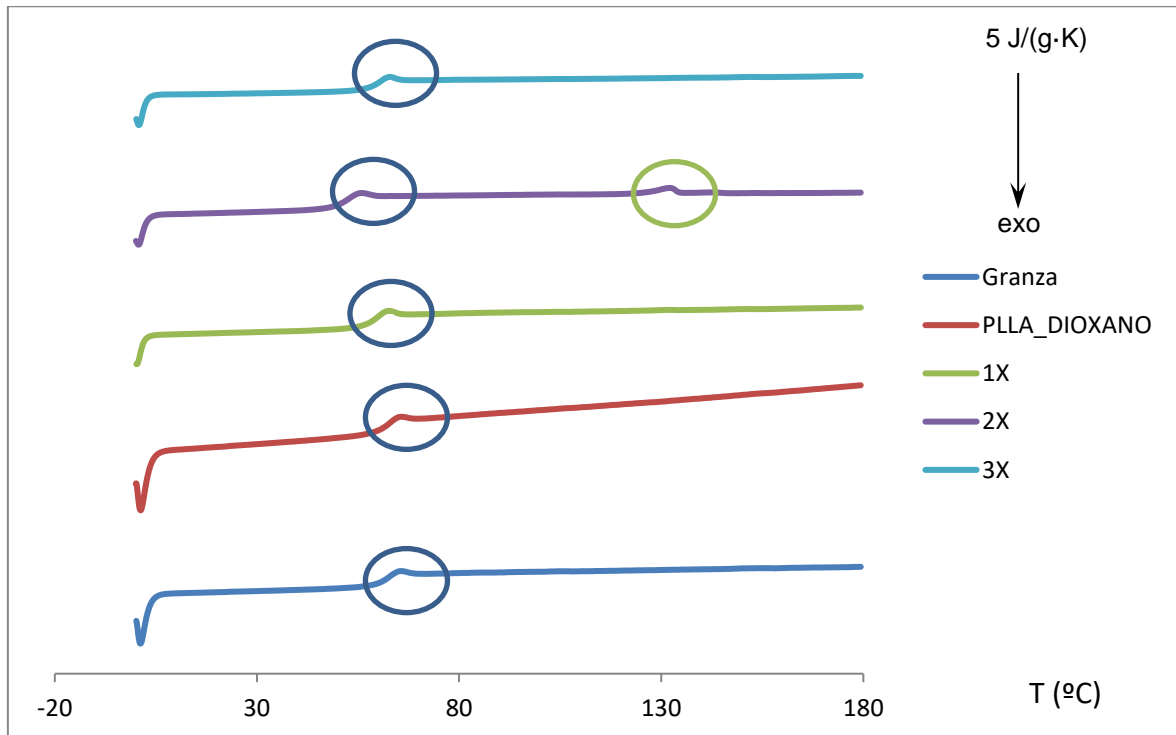


Figura 15. Gráfico DSC segundo calentamiento de diferentes estructuras de PLLA

En este gráfico (figura 15) se puede observar el valor de la transición vítrea en cada una de las distintas estructuras de PLLA (señalizados con un círculo azul), estos valores que aparecen como un punto de inflexión en la gráfica (figura 15) en la gráfica de la derivada (figura 16) se aprecian como un mínimo, los valores serán comentados más adelante. También se puede apreciar un pequeño pico de fusión a la temperatura de 129,55°C (señalizado con un círculo verde), este pico se produce por la fusión de los cristales formados en la estructura de PLLA 2X durante el primer enfriamiento, en el resto de estructuras no se puede observar dicho pico puesto que no se produjo cristalización.

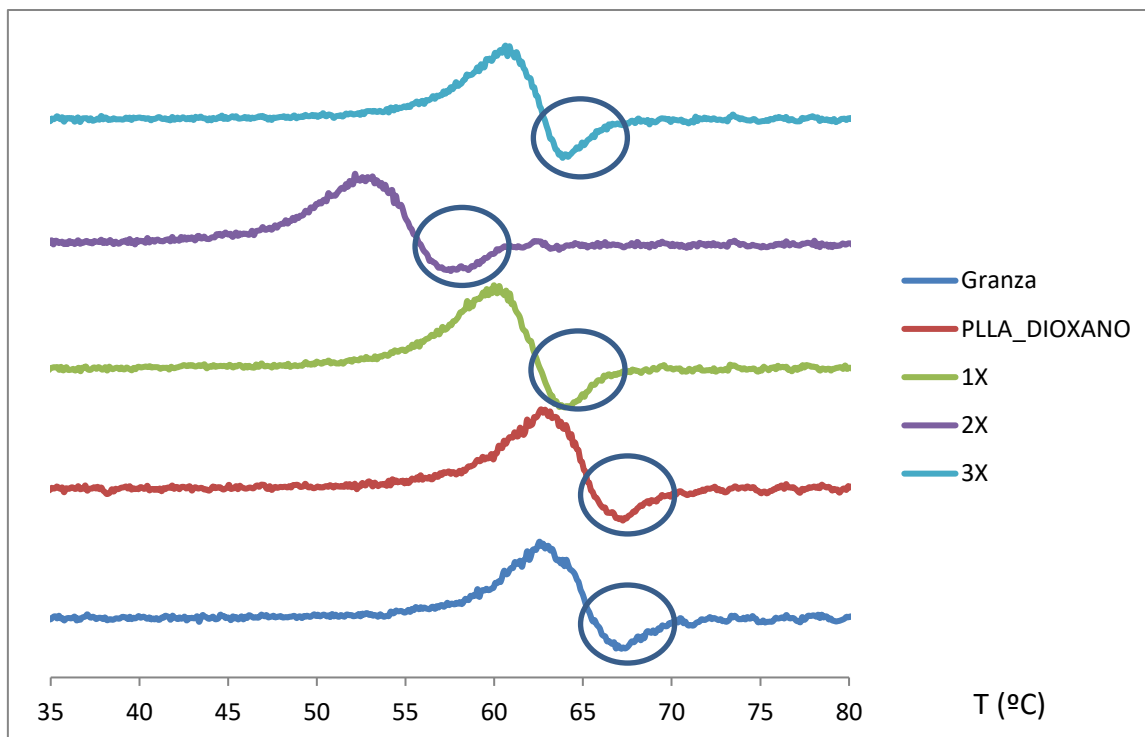


Figura 16. Gráfico DSC de la derivada del segundo calentamiento de diferentes estructuras de PLLA

En la gráfica anterior (figura 16) se puede observar nuevamente la transición vítrea como un mínimo (señalizado con un círculo azul), esta vez durante el segundo calentamiento, en la tabla siguiente (tabla 13) se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 13. Comparativa entre las propiedades de cada una de las estructuras que contienen PLLA durante el primer y el segundo calentamiento.

	Tg (°C) _{inflex point} 2º Calentamiento	Tg (°C) _{inflex point} 1º Calentamiento
PLLA Granza	62,56	62,83
PLLA+Dioxano	62,65	62,94
Disolución 1X	59,98	60,12
Disolución 2X	52,15	52,98
Disolución 3X	60,65	60,81

Como podemos observar en la tabla anterior (tabla 13), las temperaturas de transición vítrea obtenidas durante el segundo calentamiento son prácticamente las mismas que las obtenidas durante el primer calentamiento, esto se debe a que el programa de calentamiento fue el mismo y por lo tanto las variaciones no son significativas.

5.2 Degradación térmica (TGA)

La técnica de termogravimetría nos permite observar el proceso de degradación de un polímero al aplicarle calor. Estos resultados se muestran a través de termogramas, los cuales veremos a continuación.

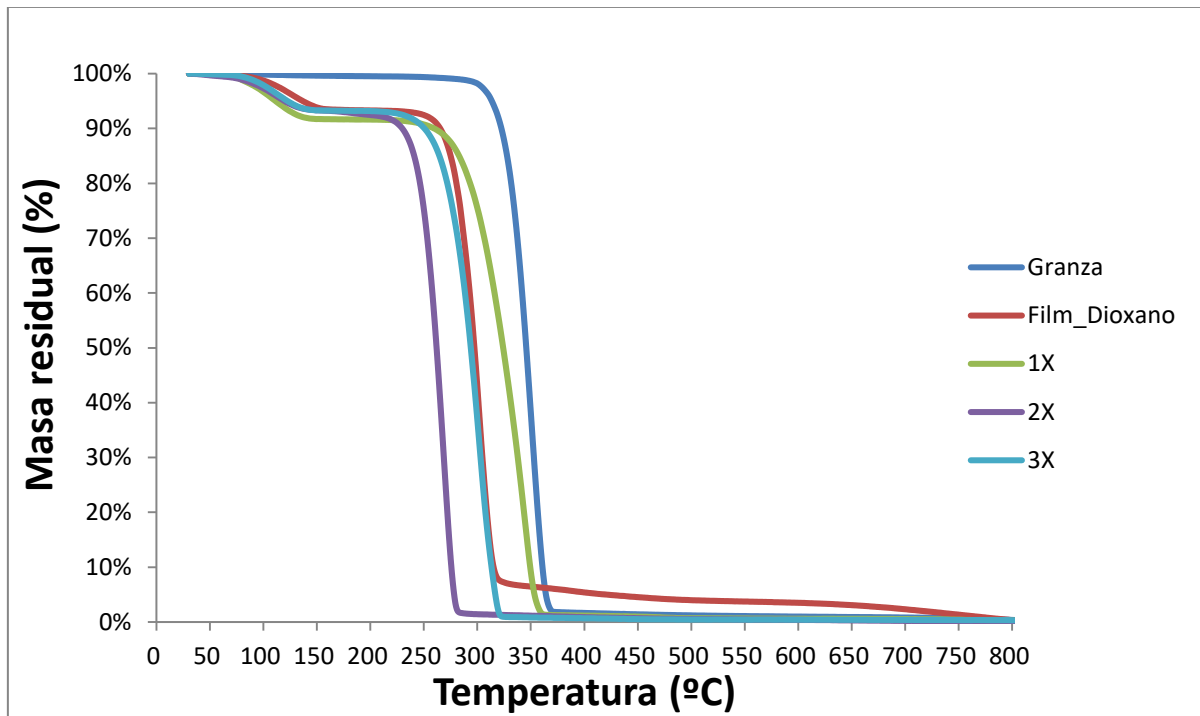


Figura 17. Gráfico TGA de la pérdida porcentual de masa residual al aplicarle temperatura a diversas estructuras de PLLA

A continuación, se procede a la elaboración de la gráfica de la derivada (figura 18) para visualizar de una mejor manera la temperatura característica del proceso de degradación, así como la temperatura de evaporación del solvente. Se puede observar además que no queda residuo orgánico una vez producida la degradación completa de cada una de las distintas estructuras de PLLA (rango de temperatura entre 260°C-360°C), esto es debido a que las disoluciones tienen poca cantidad de sal (cloruro de zinc) tal y como se corroboraba en el ensayo del DSC (no había cristalización por este motivo).

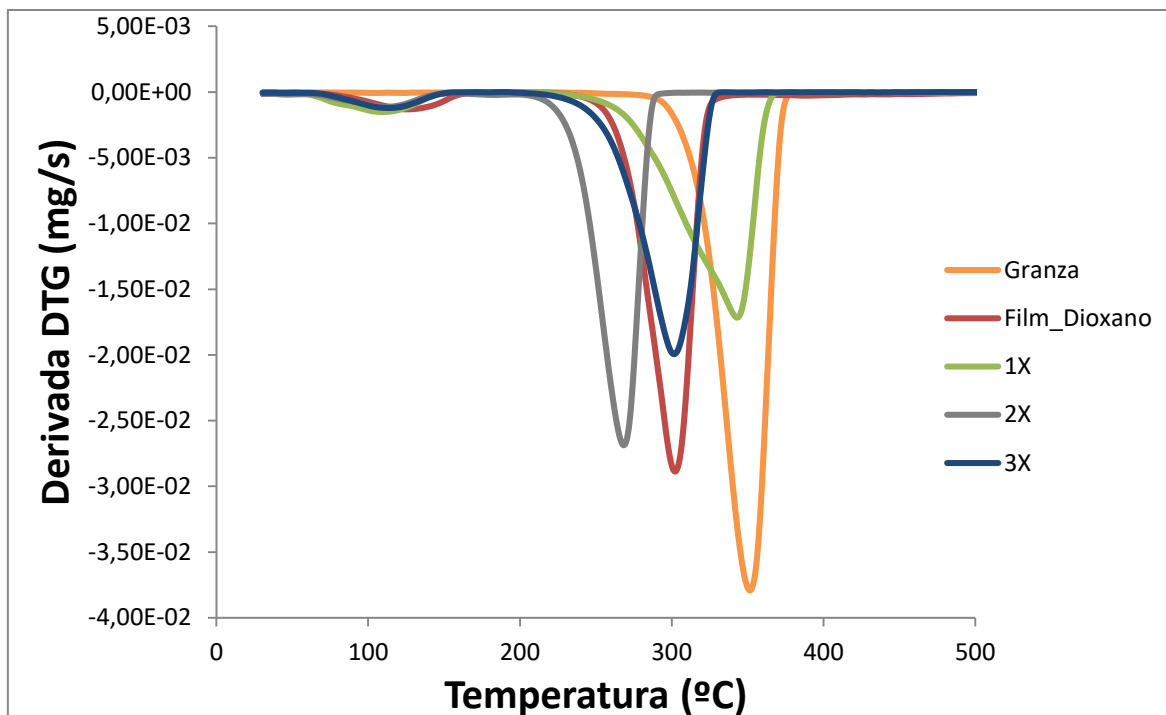


Figura 18. Gráfico TGA de la velocidad de degradación de diversas estructuras de PLLA

En los gráficos anteriores (figuras 17 y 18) se puede observar como todas las estructuras de PLLA sufren una evaporación de solvente (restos de agua y dioxano) en un rango de temperatura entre 102°C-114°C (se pueden ver los valores exactos en la tabla 14) a excepción del PLLA en granza, puesto se trata de PLLA puro. A continuación, se recoge una tabla con las temperaturas de evaporación de los solventes, así como de la temperatura de degradación de cada una de las estructuras de PLLA (tabla 14).

Tabla 14. Propiedades de cada una de las estructuras que contienen PLLA en el ensayo de termogravimetría.

	Tº de evaporación del solvente (°C)	Tº de degradación (°C)
PLLA Granza	102,39	351,60
PLLA+Dioxano	125,39	302,25
Disolución 1X	109,00	343,13
Disolución 2X	111,77	268,42
Disolución 3X	113,91	301,54

Como podemos observar en la tabla anterior (tabla 14), el rango de degradación del polímero (PLLA) es bastante amplio, lo cual habría que analizar en mayor profundidad. Sería conveniente repetir el ensayo de nuevo y en caso de obtenerse resultados similares, estudiar el comportamiento de las muestras para analizar las razones de este comportamiento.

5.3 Propiedades dinámico-mecánicas (DMA)

El equipo utilizado ha sido el **Perkin Elmer DMA 8000**, está equipado con un sistema de refrigeración ultra-eficiente que es capaz de enfriarse a $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 15 minutos usando nitrógeno líquido. El instrumento viene con un baño de fluido medioambiental opcional como accesorio integrado, lo que permite realizar verdaderos estudios de inmersión en muestras, así como medidas de propiedades mecánicas dinámicas.

El ensayo de DMA, también conocido como análisis mecánico-dinámico nos permite caracterizar el comportamiento viscoelástico de los polímeros. En nuestro caso se ha realizado un barrido de frecuencia manteniendo la temperatura fija a 37°C introduciendo cada una de las muestras en un baño de fluido, más concretamente en agua milli-Q. Con estos parámetros (temperatura e inmersión) se estaría simulando las condiciones de un cultivo celular in vitro. En este ensayo solo se ha trabajado con las dos disoluciones de los extremos (1X y 3X) y con el PLLA en granza.

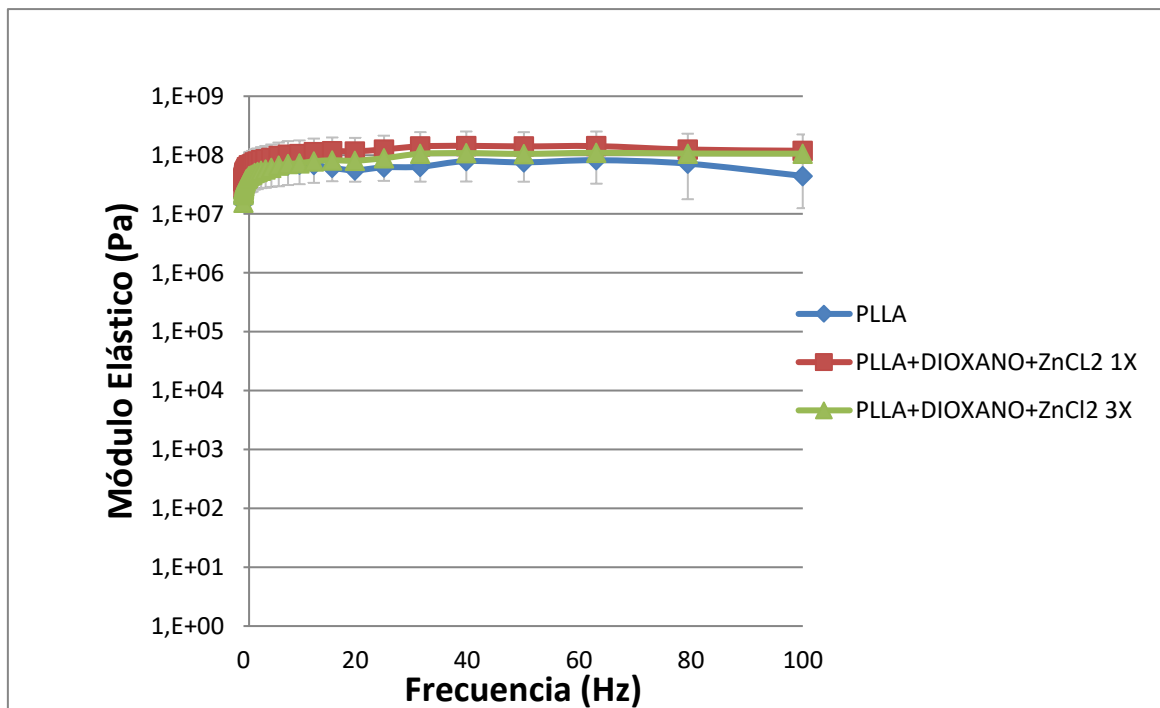


Figura 19. Gráfico DMA para determinar el módulo elástico de diversas estructuras de PLLA aplicando un barrido de frecuencia y manteniendo la temperatura constante a 37°C

En el gráfico anterior (figura 19) se puede observar como el módulo elástico aumenta ligeramente al añadir la sal (cloruro de zinc) pero el aumento no es significativo (se encuentra dentro de las bandas de desviación estándar), lo cual indica que los valores

de $ZnCl_2$ incorporados al polímero no aumentan de forma significativa las propiedades mecánicas de los *films* preparados.

5.4 Cuantificación de los iones de zinc por espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica utilizada para medir la cantidad de producto químico que contiene una sustancia. En nuestro caso, se ha utilizado para medir la cantidad de zinc que era liberado en doce medidas de tiempo diferentes.

5.5 Curva Patrón

Se realizó una curva patrón con 8 puntos distintos obteniéndose los siguientes resultados de absorbancia.

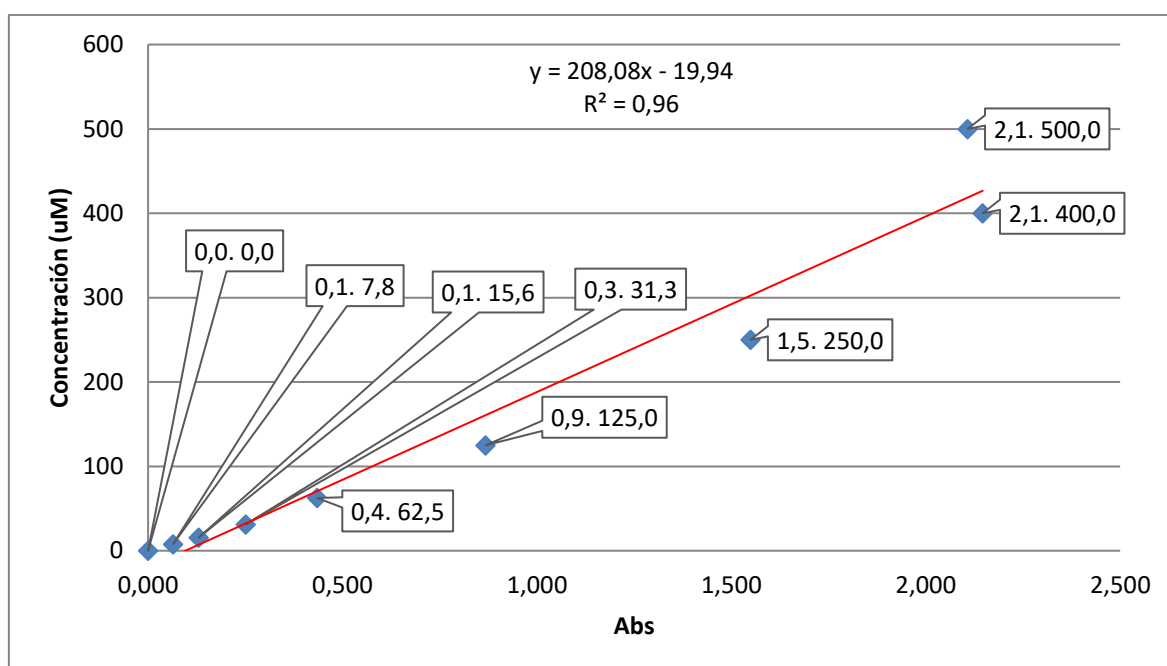


Figura 20. Gráfico de relación entre la concentración de disolución y la absorbancia producida

En el gráfico anterior (Figura 20) se puede apreciar como al aumentar la concentración de $ZnCl_2$ aumenta la absorbancia, existiendo una dependencia funcional entre las variables, puesto que el coeficiente de determinación $R^2=0,96$.

5.6 PLLA+Dioxano

Tiempo (min)	10	20	30	40	50	60	90	120	150	240	1440	4320
Concentración (μM)	94,75	96,25	95,72	94,48	92,50	89,34	91,53	90,71	86,67	91,56	91,92	93,17

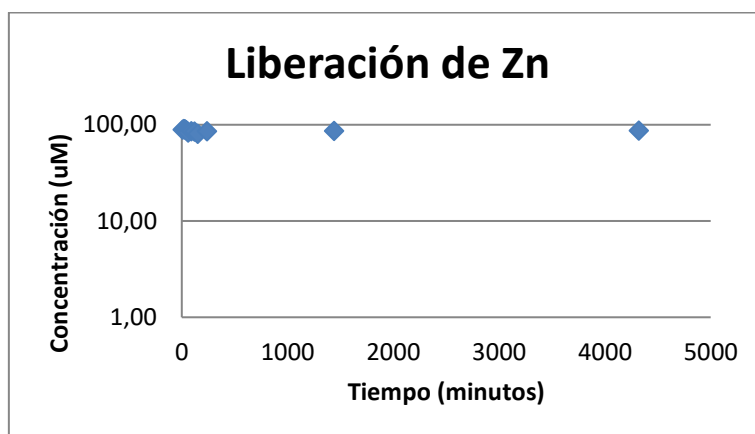


Figura 21. Relación entre las distintas medidas de tiempo realizadas y la concentración de zinc

En el gráfico anterior (figura 21) se puede observar la concentración (μM) liberada en una disolución de PLLA+Dioxano con valores de concentración entre 86 μM y 97 μM, lo que resulta curioso es que en dicha disolución no existe presencia alguna de cloruro de zinc (ZnCl₂), por lo tanto, la liberación no puede ser de iones Zn⁺², lo que nos lleva a pensar en la posibilidad de que el zinc reaccione con el PLLA dando lugar a estos valores de liberación.

5.7 PLLA+Dioxano+ZnCl₂ 1X

Tiempo (min)	10	20	30	40	50	60	90	120	150	240	1440	4320
Concentración (μM)	91,08	95,66	94,05	90,14	87,68	87,78	86,91	87,81	86,42	86,38	84,12	87,95

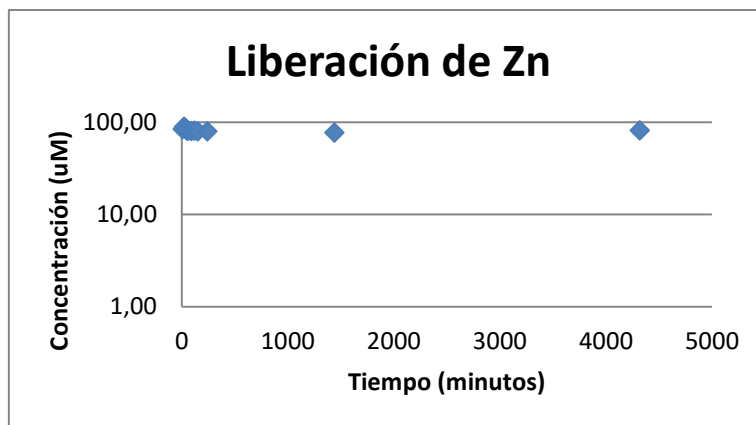


Figura 22. Relación entre las distintas medidas de tiempo realizadas y la concentración de zinc

5.8 PLLA+Dioxano+ZnCl₂ 2X

Tiempo (min)	10	20	30	40	50	60	90	120	150	240	1440	4320
Concentración (µM)	85,69	88,91	87,96	91,22	88,23	87,14	85,14	85,34	88,03	84,13	87,04	89,52

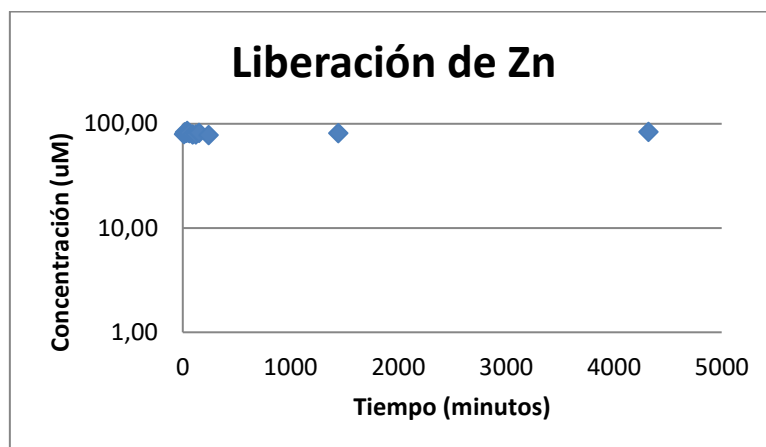


Figura 23. Relación entre las distintas medidas de tiempo realizadas y la concentración de zinc

5.9 PLLA+Dioxano+ZnCl₂ 3X

Tiempo(min)	10	20	30	40	50	60	90	120	150	240	1440	4320
Concentración (μM)	80,34	85,38	85,33	82,44	86,71	85,87	82,95	86,11	85,66	85,85	86,52	88,18

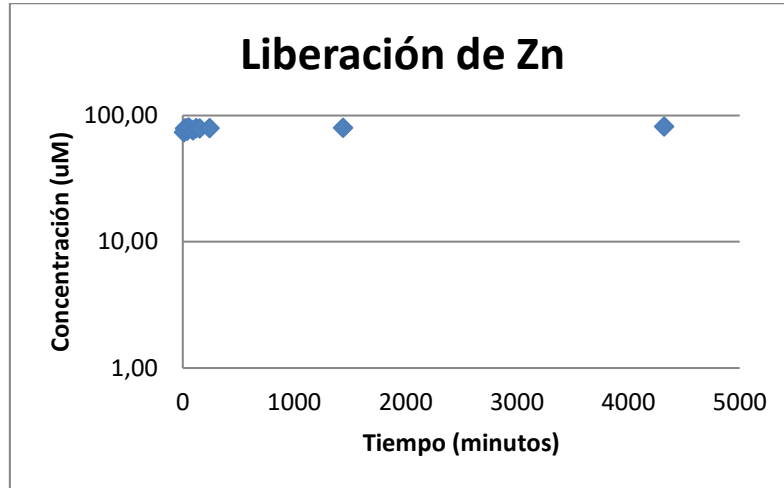


Figura 24. Relación entre las distintas medidas de tiempo realizadas y la concentración de zinc

Tal y como se puede observar en las gráficas anteriores (figuras 22-23-24) la concentración (μM) liberada por cada una de las distintas disoluciones que contenían cloruro de zinc (ZnCl₂) en concentraciones distintas (1X, 2X, 3X) han liberado concentraciones muy parecidas de iones Zn⁺², además cabe añadir, que dichos valores de liberación son muy similares a los producidos por la disolución de PLLA en dioxano sin la presencia de la sal (figura 21). Lo que nos lleva a deducir que la concentración liberada de iones Zn⁺² es muy pequeña o inexistente. Por tanto, los valores de concentración obtenidos puede que hayan sido producidos, tal y como se ha comentado anteriormente, por una reacción del zincon con el PLLA.

6. Conclusiones

En el presente TFG se han analizado las distintas propiedades fisicoquímicas de soportes celulares poliméricos preparados con ácido poliláctico y cargados con iones bioactivos de zinc mediante la utilización de diversos ensayos y técnicas diferentes. Se han realizado pruebas iniciales y ensayos precedentes (se utilizó el cloroformo como solvente del PLLA, pero al mezclarlo con la disolución de $ZnCl_2$ se producía separación de fases) hasta obtener una metodología adecuada para la obtención de sustratos celulares cargados con sales de cloruro de zinc y analizar la capacidad de liberación de iones de zinc a partir de distintas concentraciones de sales. Los resultados obtenidos indican que para la liberación de iones de zinc a partir de sales de $ZnCl_2$ habría que incrementar la cantidad de sal en la preparación de la disolución de partida, ya que, al tratarse el PLLA de un material hidrófobo, el acceso del agua al interior de la muestra para la disolución de la sal y la liberación de iones de zinc a su interior está muy restringido. El ensayo de liberación también indica que las sales se encuentran en el interior de los soportes celulares y no en la superficie. El trabajo TFG ha supuesto el punto de partida para la preparación de soportes celulares con capacidad de liberación de iones de zinc, ya que la técnica elegida (mezcla de disoluciones dioxano-PLLA y $ZnCl_2$ -agua) ha mostrado resultados satisfactorios. Las muestras tienen un grosor adecuado y no son frágiles, además, las muestras no muestran separación de fases entre las dos disoluciones, un resultado altamente positivo. La aplicación de la metodología empleada para la preparación de los sustratos y el aumento de la concentración de sales permitirá preparar, en trabajos futuros, sustratos celulares con liberación de moléculas bioactivas para aplicaciones de regeneración muscular.

7. Glosario de términos

- PLLA: Acido poli-L-láctico, del inglés *Poly-L-Lactic Acid*
- CBIT: Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular
- UPV: Universidad Politécnica de Valencia
- ETSID: Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño
- DSC: *Differential Scanning Calorimetry*
- TGA: Termogravimetría
- DMA: *Dynamic Mechanical Analysis*

8. Bibliografía

- [1] Griffith, L.G; Naughton, G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. Medline, EEUU.
- [2] Infante, R.; Cebrián, A.; Vara, A., (2005-2006). Ingeniería de tejidos. *Los polímeros en medicina*. Universidad de Valladolid.
- [3] J. D. SIPE, "Tissue Engineering and Reparative Medicine," Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 961, no. 1, pp. 1–9, 2002.
- [4] M. A. Lizarbe, "Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales a La Ingenieria Tisular," Cienc.Exact.Fis.Nat. (Esp), vol. 101, no. 1, pp. 227–249, 2007.
- [5] Berridge, M.J. (2012). Cell Signaling Biology. Ed: Portlandpress. Londres. Recuperado de:
https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_muscular.php
- [6] Piña, M.C (1987). La física en la medicina. *La ciencia para todos*. Ed.: Fondo de cultura económica, México. Recuperado de:
http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/37/htm/sec_14.htm
- [7] Lee CH, Singla A, Lee Y(2001) Biomedical applications of collagen. Int J Pharm, 221:1-22.
- [8] Singh R, Dahotre NB (2007) Corrosion, degradation and prevention by surface modification of biometallic materials. J Mater Sci Mater Med. 18:725-751.
- [9] Valimaki VV, Aro HT. (2006) Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. Scand J Surg, 95:95-102.
- [10] L. Xiao, B. Wang, G. Yang, and M. Gauthier, "Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications," Biomed. Sci. Eng. Technol., pp. 247–282, 2006.
- [11] Oligoelementos: Yodo, zinc, cobre, selenio, manganeso, molibdeno, cromo y cobalto. En: Tojo R, editor. Madrid: Ed. Doyma, 2001; 229-244.
- [12] National Research Council. (1989). Recommended dietary allowances. National Academies Press.

- [13] Cunningham, B. C., Bass, S., Fuh, G., & Wells, J. A. (1990). Zinc mediation of the binding of human growth hormone to the human prolactin receptor. *Science*, 250(4988), 1709-1713.
- [14] Chesters, J. K. (1992). Trace Element-Gene Interactions. *Nutrition reviews*, 50(8), 217-223.
- [15] Castillo-Duran, C., & Cassorla, F. (1999). Trace minerals in human growth and development. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 12(5), 589-602.
- [16] Rubio, C., González Weller, D., Martín-Izquierdo, R. E., Revert, C., Rodríguez, I., & Hardisson, A. (2007). El zinc: oligoelemento esencial. *Nutrición Hospitalaria*, 22(1), 101-107.
- [17] National Research Council. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Institute of Medicine/Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington DC, 2001.
- [18] Moyad MA. Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem. *Urol Nurs* 2004; 24(1):49-52.
- [19] F. Guerra Pérez and H. Vallejo Martín, "Acido poliláctico."
- [20] E. Bardone, A. Brucato, T. Keshavarz, F. F. C. Pavia, S. Rigogliuso, V. La Carrubba, G. A. Mannella, G. Ghersi, V. Brucato, V. La Carrubba, G. A. Mannella, G. Ghersi, V. Brucato, E. Bardone, A. Brucato, T. Keshavarz, F. F. C. Pavia, S. Rigogliuso, V. La Carrubba, G. A. Mannella, G. Ghersi, and V. Brucato, "Poly Lactic Acid Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 27, pp. 409–414, 2012.
- [21] P. Jimenez Bonilla, M. Sibaja Ballesteros, and J. Vega-Baudrit, "SINTESIS Y 103 CARACTERIZACION DE POLI (ACIDO L – LACTICO) POR POLICONDENSACION DIRECTA, OBTENIDO DEL FERMENTO DE VARIEDAD Cavendish CULTIVAR (Gran naine) EN COSTA RICA," vol. 13, no. 2, pp. 52–59, 2012.
- [22] K. Weissmehl and H.-J. Arpe, "Química orgánica industrial." Editorial Reverte, 1978.
- [23] "Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 1,4-dioxano." [Online]. Available: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts187.html.
- [24] Handbook of Chemistry and Physics, 71st edition, CRC Press, Ann Arbor, Michigan, 1990.

- [25] M. J. Bossingham, N. S. Carnell, and W. W. Campbell, "Water balance, hydration status, and fat-free mass hydration in younger and older adults," *Am J Clin Nutr*, vol. 81, no. 6, pp. 1342–1350, Jun. 2005.
- [26] Carbajal Azcona A and Gonzales Fernandez M, "Propiedades físicas y químicas del agua," *Agua*, 2013.
- [27] R.M. Rush *Analytical Chemistry* 26, 1345-1345, (1954).
- [28] J.A. Platte *Analytical Chemistry* 31, 1226-1226, (1959).
- [29] J.T. McCall et al. *Analytical Chemistry* 30, 1345-1345, (1958).
- [30] Säbel, C. E., Neureuther, J. M., & Siemann, S. (2010). A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Analytical biochemistry*, 397(2), 218-226.
- [31] E. Freire, "Differential Scanning Calorimetry," in *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*, B. A. Shirley, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 1995, pp. 191–218.
- [32] T. Hatakeyama, "Thermal Analysis. Fundamentals and applications to polymer science," 1999.
- [33] Jin, Z., Pramoda, K. P., Xu, G., & Goh, S. H. (2001). Dynamic mechanical behavior of melt-processed multi-walled carbon nanotube/poly (methyl methacrylate) composites. *Chemical Physics Letters*, 337(1), 43-47.
- [34] Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S. M., Dillon, J. G., & Hughes, M. K. (1993). Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHB/VA). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 27(9), 1135-1148.

Pliego de condiciones

En el siguiente apartado se incluyen las condiciones y especificaciones de todos los procedimientos y especificaciones para tener en cuenta para la realización del TFG. Se ha dividido en:

- **Pliego de condiciones generales:** donde se recopilan todas las condiciones legales y normativas aplicables al TFG.
- **Pliego de especificaciones técnicas:** en él se especificarán las características técnicas y de seguridad de los materiales y los equipos utilizados.
- **Pliego de prescripciones de gestión de los residuos:** donde se incluye en todos los aspectos relacionados con las operaciones de tratamiento de residuos de reactivos y material de laboratorio.

1. Pliego de condiciones generales

1.1 Normativa

Se ha seguido la normativa establecida por el C.B.I.T. en cuanto a seguridad en el trabajo, salud y protección medioambiental. Todas las normas para esto están incluidas en el “Manual Básico de Seguridad y Prevención de Riesgos del C.B.I.T.”, que a su vez está sujeto al “Manual de Prevención de Riesgos Laborales de la U.P.V.”, así como a toda la normativa vigente para proyectos de investigación experimental, que es el marco en el que el proyecto ha sido llevado a cabo. Todas las normas de seguridad e higiene en el trabajo asumidas, pues, han sido dictaminadas y reguladas por el Ministerio de Trabajo. La normativa aplicada a este proyecto se enmarca en los denominados “de investigación experimental”, y es la empleada durante todo el trabajo en el laboratorio. Dicha normativa de Seguridad e Higiene en el Trabajo está regulada por el Ministerio de Trabajo. Concretamente, se tiene en especial consideración en cumplimiento de la Ordenanza General de Seguridad e Higiene en el trabajo, que corresponde a lo estipulado en el B.O.E nº 269 del 10 noviembre de 1995 en referencia a la ley ordinaria de Prevención de Riesgos naturaleza del tipo de investigación, los materiales utilizados y el entorno de trabajo son:

- **Artículo 16** “Plan de prevención de riesgos laborales, evaluación de los riesgos, y planificación de la actividad preventiva”

Modificado por LEY 54/2003

1. La prevención de riesgos laborales deberá integrarse en el sistema general de gestión de la empresa, tanto en el conjunto de sus actividades como en todos los niveles jerárquicos de esta, a través de la implantación y aplicación de un plan de prevención de riesgos laborales a que se refiere el párrafo siguiente. Este plan de prevención de riesgos laborales deberá incluir la estructura organizativa, las responsabilidades, las funciones, las prácticas, los procedimientos, los procesos y los recursos necesarios para realizar la acción de prevención de riesgos en la empresa, en los términos que reglamentariamente se establezcan.

Modificado por LEY 54/2003

2. Los instrumentos esenciales para la gestión y aplicación del plan de prevención de riesgos, que podrán ser llevados a cabo por fases de forma programada, son la evaluación de riesgos laborales y la planificación de la actividad preventiva a que se refieren los párrafos siguientes:

- a. El empresario deberá realizar una evaluación inicial de los riesgos para la seguridad y salud de los trabajadores, teniendo en cuenta, con carácter general, la naturaleza de la actividad, las características de los puestos de trabajo existentes y de los trabajadores que deban desempeñarlos. Igual evaluación deberá hacerse con ocasión de la elección de los equipos de trabajo, de las sustancias o preparados químicos y del acondicionamiento de los lugares de trabajo. La evaluación inicial tendrá en cuenta aquellas otras actuaciones que deban desarrollarse de conformidad con lo dispuesto en la normativa sobre protección de riesgos específicos y actividades de especial peligrosidad. La evaluación será actualizada cuando cambien las condiciones de trabajo y, en todo caso, se someterá a consideración y se revisará, si fuera necesario, con ocasión de los daños para la salud que se hayan producido.

Cuando el resultado de la evaluación lo hiciera necesario, el empresario realizara controles periódicos de las condiciones de trabajo y de la actividad de los trabajadores en la prestación de sus servicios, para detectar situaciones potencialmente peligrosas.

- b. Si los resultados de la evaluación prevista en el párrafo a) pusieran de manifiesto situaciones de riesgo, el empresario realizara aquellas

actividades preventivas necesarias para eliminar o reducir y controlar tales riesgos. Dichas actividades serán objeto de planificación por el empresario, incluyendo para cada actividad preventiva el plazo para llevarla a cabo, la designación de responsables y los recursos humanos y materiales necesarios para su ejecución.

El empresario deberá asegurarse de la efectiva ejecución de las actividades preventivas incluidas en la planificación, efectuando para ello un seguimiento continuo de la misma.

Las actividades de prevención deberán ser modificadas cuando se aprecie por el empresario, como consecuencia de los controles periódicos previstos en el párrafo a) anterior, su inadecuación a los fines de protección requeridos.

Añadido por LEY 25/2009

3. Las empresas, en atención al número de trabajadores y a la naturaleza y peligrosidad de las actividades realizadas, podrán realizar el plan de prevención de riesgos laborales, la evaluación de riesgos y la planificación de la actividad preventiva de forma simplificada, siempre que ello no suponga una reducción del nivel de protección de la seguridad y salud de los trabajadores y en los términos que reglamentariamente se determinen.
 4. Cuando se haya producido un daño para la salud de los trabajadores o cuando, con ocasión de la vigilancia de la salud prevista en el artículo 22, aparezcan indicios de que las medidas de prevención resultan insuficientes, el empresario llevará a cabo una investigación al respecto, a fin de detectar las causas de estos hechos.
- **Artículo 17** “Equipos de trabajo y protección”
1. El empresario adoptará las medidas necesarias con el fin de que los equipos de trabajo sean adecuados para el trabajo que deba realizarse y convenientemente adaptados a tal efecto, de forma que garanticen la seguridad y la salud de los trabajadores al utilizarlos. Cuando la utilización de un equipo de trabajo pueda presentar un riesgo específico para la seguridad y la salud de los trabajadores, el empresario adoptará las medidas necesarias con el fin de que:

- a. La utilización del equipo de trabajo quede reservada a los encargados de dicha utilización.
 - b. Los trabajos de reparación, transformación, mantenimiento o conservación sean realizados por los trabajadores específicamente capacitados para ello.
2. El empresario deberá proporcionar a sus trabajadores equipos de protección individual adecuados para el desempeño de sus funciones y velar por el uso efectivo de los mismos cuando, sean necesarios. Los equipos de protección individual deberán utilizarse cuando los riesgos no se puedan evitar o no puedan limitarse suficientemente por medios técnicos de protección colectiva o mediante medidas, métodos o procedimientos de organización del trabajo.

○ **Artículo 18** “Información consulta y participación de los trabajadores”

1. A fin de dar cumplimiento al deber de protección establecido en la presente Ley, el empresario adoptará las medidas adecuadas para que los trabajadores reciban todas las informaciones necesarias en relación con:
- a. Los riesgos para la seguridad y la salud de los trabajadores en el trabajo, tanto aquellos que afectan a la empresa en su conjunto como a cada tipo de puesto de trabajo o función
 - b. Las medidas y actividades de protección y prevención aplicables a los riesgos señalados en el apartado anterior.
 - c. Las medidas adoptadas de conformidad con lo dispuesto en el artículo 20 de la presente Ley.

En las empresas que cuentan con representantes de los trabajadores, la información a que se refiere el presente apartado se facilitará por el empresario a los trabajadores a través de dichos representantes; no obstante, deberá informarse directamente a cada trabajador de los riesgos específicos que afecten a su puesto de trabajo o función y de las medidas de protección y prevención aplicables a dichos riesgos.

2. El empresario deberá consultar a los trabajadores, y permitir su participación, en el marco de todas las cuestiones que afectan a la seguridad y a la salud en el trabajo, de conformidad con lo dispuesto en el capítulo V de la presente Ley. Los trabajadores tendrán derecho a efectuar propuestas al empresario, así como a los órganos de participación y presentación previstos en el capítulo V

de esta Ley, dirigidas a la mejora de los niveles de protección de la seguridad y la salud en la empresa.

○ **Artículo 19** *“Formación de los trabajadores”*

1. En cumplimiento del deber de protección, el empresario deberá garantizar que cada trabajador reciba una formación teórica y práctica, suficiente y adecuada, en materia preventiva, tanto en el momento de su contratación, cualquiera que sea la modalidad o duración de ésta, como cuando se produzcan cambios en las funciones que desempeñe o se introduzcan nuevas tecnologías o cambios en los equipos de trabajo. La formación deberá estar centrada específicamente en el puesto de trabajo o función de cada trabajador, adaptarse a la evolución de los riesgos y a la aparición de otros nuevos y repetirse periódicamente, si fuera necesario.
2. La formación a que se refiere el apartado anterior deberá impartirse, siempre que sea posible, dentro de la jornada de trabajo o, en su defecto, en otras horas, pero con el descuento en aquélla del tiempo invertido en la misma. La formación se podrá impartir por la empresa mediante medios propios o concertándola con servicios ajenos, y su coste no recaerá en ningún caso sobre los trabajadores.

○ **Artículo 20** *“Medidas de emergencia”*

El empresario, teniendo en cuenta el tamaño y la actividad de la empresa, así como la posible presencia de personas ajenas a la misma, deberá analizar las posibles situaciones de emergencia y adoptar las medidas necesarias en materia de primeros auxilios, lucha contra incendios y evacuación de los trabajadores, designando para ello al personal encargado de poner en práctica estas medidas y comprobando periódicamente, en su caso, su correcto funcionamiento. El citado personal deberá poseer la formación necesaria, ser suficiente en número y disponer del material adecuado, en función de las circunstancias antes señaladas.

Para la aplicación de las medidas adoptadas, el empresario deberá organizar las relaciones que sean necesarias con servicios externos a la empresa, en particular en materia de primeros auxilios, asistencia médica de urgencia, salvamento y lucha contra incendios, de forma que quede garantizada la rapidez y eficacia de las mismas.

2. Pliego de especificaciones técnicas

2.1 Fichas de seguridad de los reactivos

Para la obtención de las fichas de seguridad de los reactivos, se ha buscado la información proporcionada por los proveedores, donde vienen dadas tanto la nomenclatura del material como las características, propiedades y recomendaciones de seguridad que hay que tener siempre presente a la hora de trabajar con ellos.

2.1.1 PLLA

Ficha de datos de seguridad de acuerdo con 29 CFR 910.1200, ANSI Z400.1-2004, y ISO 11014-1:1994.

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

- **Identificadores del producto**

- Nombre del producto: Biopolímero Ingeo TM; Referencia: 4042D
- Uso del producto: Puede ser usado para termoconformado, inyección en molde, revestimientos, moldeado por soplado y aplicaciones de fibra.

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

- **Visión general de emergencia:**

PRECAUCIÓN: Puede causar irritación de los ojos/piel. La combustión produce humos nocivos y tóxicos. Evitar el contacto con la piel y los ojos. Evitar la formación de polvo y aerosoles.

- Aspecto: Claro, translúcido, opaco, pellets.
- Color: Transparente, traslúcido, opaco.
- Estado físico: Sólido.
- Olor: Dulce.

- **Efectos potenciales sobre la salud:**

- Contacto con ojos: El contacto con los ojos puede causar irritación.

- Contacto con la piel: La sustancia puede provocar una ligera irritación de la piel.
- Ingestión: La ingestión puede causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y diarrea
- Inhalación: La inhalación de polvo puede causar dificultad para respirar, opresión en el pecho, dolor de garganta y tos. Bajo riesgo para manejo industrial o comercial normal.
- Efectos sobre los órganos: No se observaron efectos en los órganos después de la ingestión o exposición dérmica en estudios con animales.
- Sensibilización: No produce sensibilización en animales de laboratorio
- Peligros específicos: No hay información disponible.
- Fuego: Polvo fino disperso en el aire puede encenderse.
- Precauciones ambientales: No determinado. Ver sección 12 para más información

Clasificación NFPA			
Salud: 1	Flamm: 1	Reactividad: 0	Especial: No determinado
Clasificación HMIS			
Salud: 1	Flamm: 1	Reactividad: 0	EPI's: No determinado

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

- Identificación: Resina de polilactida 9051-89-2
- Peso %: >98
- Límites de exposición OSHA: Ninguno
- Límites de exposición ACGIH: Ninguno
 Todos los ingredientes en cantidades >1.0% (0.1% para los carcinógenos) que son potencialmente peligrosos por las definiciones de OSHA.
- Otras normas: Este material puede generar partículas no clasificables (PNOC) La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) PEL/TWA para PNOC es 15 mg / m³ para polvo y 5 mg/ m³ para la fracción respirable.

4. PRIMEROS AUXILIOS

- **Contacto con los ojos:** Enjuagar inmediatamente con abundante agua, también debajo de los párpados, por lo menos, 15 min. Llame inmediatamente al médico.
- **Contacto con la piel:** Lavar inmediatamente con abundante agua durante al menos 15 minutos. Si persiste la irritación en la piel, llame a un médico. Refrescar la piel rápidamente con agua fría después del contacto con el polímero caliente.
- **Inhalación:** Salir al aire libre. Llame inmediatamente al médico.
- **Ingestión:** Beber agua como medida de precaución. No dar nada por la boca a una persona inconsciente. No provocar vómitos sin consejo médico. Llame inmediatamente al médico.
- **Notas para el médico:** Tratar sintomáticamente.

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

- **Inflamabilidad:**
 - Temperatura de autoignición: 388 °C
- **Límites de inflamabilidad en aire:**
 - Límites de inflamabilidad en aire – inferior (%): No aplicable.
 - Límites de inflamabilidad en aire – superior (%): No aplicable.
- **Medios de extinción adecuados:** Espuma. Agua. Dióxido de carbono (CO₂). Producto químico seco. Espumas resistentes al alcohol son preferibles si están disponibles. De propósito general espumas sintéticas (incluyendo AFFF) o espumas de proteínas pueden funcionar, pero de manera mucho menos eficaz.
- **Medios de extinción que no deben utilizarse por razones de seguridad:** No hay información disponible.
- **Productos de descomposición peligrosos:** La combustión produce humos nocivos y tóxicos, aldehídos, monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂).
- **Equipo de protección especial para los bomberos:** Como en cualquier incendio, llevar autónomo equipo de respiración con demanda de presión, MSHA / NIOSH (aprobado o equivalente) y equipo completo de protección.
- **Bajo condiciones de incendio:** Enfríe los recipientes / tanques con pulverización por agua. Puede utilizarse vapor de agua para enfriar los contenedores cerrados.

Información adicional: El polvo fino disperso en el aire puede encenderse. Los riesgos de ignición seguidos de propagación de la llama o de explosiones

secundarias se puede prevenir evitando la acumulación de polvo, por ejemplo, en pisos y repisas.

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

- Precauciones personales: Utilícese equipo de protección personal. Ver Sección 8. Elimine todas las fuentes de ignición. Evitar la formación de polvo. Evite el contacto con la piel y los ojos. Barrer para prevenir el riesgo de resbalones.
- Precauciones ambientales: No echar al agua superficial o al sistema de alcantarillado sanitario. No permita que el material contamine el agua del subsuelo.
- Métodos de limpieza: Recoger en un contenedor apropiado para su eliminación.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

• Precauciones para una manipulación segura

- Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evitar formación de neblina. Los trabajadores deben ser protegidos de la posibilidad de entrar en contacto con el material fundido durante la manipulación. Bajo riesgo para manejo industrial o comercial normal. Usar equipo de protección personal. Vea la Sección 8.

• Almacenamiento

- Conservar en lugar fresco. Mantener a temperaturas inferior a (50°C)

No hay restricciones en almacenamiento con otros productos.

- Precauciones: No requiere precauciones especiales.

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL

- Disposiciones de ingeniería: Donde sea razonablemente practicable, esto debe lograrse mediante el uso ventilación local y una buena extracción general.
- Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares donde se forma polvo.
- Parámetros de control: Ninguno
- Equipo de protección individual:
 - Protección de ojos: Gafas protectoras con cubiertas laterales.
 - Protección piel y cuerpo: Indumentaria impermeable.
 - Protección respiratoria: Se debe usar mascarilla si se expone al

polvo. Se necesita protección respiratoria si alguno de los límites de exposición de la Sección 2 se superan. Consulta a un profesional de higiene industrial antes de la selección del respirados a utilizar.

- ADVERTENCIA: Los respiradores purificadores de aire no protegen a los trabajadores en atmósferas deficientes de oxígeno.
- Protección de las manos: Protección preventiva de la piel.
- Medidas de higiene: Evitar el contacto con la piel, ojos y ropa.
- Límites de exposición: Ver la Sección 3.

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

• Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- Aspecto: Claro, translúcido, opaco, pellets.
- Color: Claro, translúcido, opaco.
- Estado físico: Sólido.
- Olor: Dulce.
- pH: No aplicable
- Presión de vapor: Sin determinar
- Densidad de vapor: Sin determinar
- Tasa de evaporación: No determinado
- Densidad: 1.24 g/ cc
- Punto de ebullición/rango: No aplicable.
- Temperatura de descomposición: 250 °C
- Temperatura de fusión/rango: indeterminado
- Solubilidad en agua: Insoluble
- Solubilidad en otros disolventes: No se conocen.

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

• Estabilidad química

Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.

• Condiciones que evitar

Temperaturas por encima de 230 °C

• Material que deben evitarse

Agentes oxidantes. Bases fuertes.

• Productos de descomposición peligrosa

La combustión produce humos nocivos y tóxicos, aldehídos, monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂).

- **Polimerización**

No aplicable

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

- Vías principales de exposición: Contacto con los ojos. Contacto con la piel. Inhalación. Ingestión.
- Toxicidad aguda: No hubo efectos en órganos diana después de la ingestión o absorción cutánea en estudios con animales.
- Efectos locales: Puede causar irritación de los ojos / piel. El polvo del producto puede ser irritante para los ojos, la piel y el sistema respiratorio. Puede causar una leve o moderada irritación conjuntival en irritación de los ojos (estudios usando conejos). Puede causar enrojecimiento muy leve. (estudios de irritación dérmica utilizando conejos).
- La ingestión puede causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y diarrea.
- Toxicidad a largo plazo: No produce reacciones alérgicas en la piel en estudios de sensibilización de la piel usando conejillos de indias.
- Efectos específicos: Puede causar irritación y / o dermatitis. La ingestión puede causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y diarrea.
- La inhalación de polvo puede causar dificultad para respirar, opresión en el pecho, dolor de garganta y tos. La combustión produce vapores irritantes.
- Efectos mutagénicos: No es mutágeno en la prueba de AMES.
- Toxicidad para la reproducción: No hay datos disponibles sobre los mismos.
- Efectos carcinógenos: No hay datos disponibles sobre este producto.
- Efectos sobre los órganos: No hubo efectos en órganos diana después de la ingestión o exposición dérmica en estudios con animales.
- Piel: DL50 / dérmica / conejo > 2.000 mg / kg
- Ingestión: DL50 / oral / rata > 5000 mg / kg.

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

- Movilidad: No hay datos disponibles.
- Bioacumulación: No debe bioacumularse. Intrínsecamente biodegradable.
- Efectos ecotoxicológicos: CE50/ 72 h / algas > 1100 mg / L

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

- **Métodos para el tratamiento de residuos**
 - De conformidad con las regulaciones locales y nacionales.
 - No contaminar los estanques, ríos o acequias con producto químico o envase usado. Contacte con el fabricante.
LA EMPRESA NO TIENE CONTROL SOBRE LAS PRÁCTICAS DE GESTIÓN NI LOS PROCESOS DE FABRICACIÓN DE PARTES QUE MANEJAN O USAN ESTE MATERIAL. LA INFORMACIÓN PRESENTADA EN ESTE DOCUMENTO SE REFIERE SOLAMENTE AL PRODUCTO ENVIADO EN LAS CONDICIONES PREVISTAS Y DESCRITAS EN MSDS SECCIÓN 2. (Composición / Información sobre los ingredientes).
 - Envases contaminados: Vaciar el contenido restante. No vuelva a utilizar los envases vacíos. Los contenedores deben ser transportados para su vacío usando un portador de residuos registrado.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

- **IMDG:**
 - Nombre propio del transporte: Ninguno
 - Clase de peligro: No está regulado.
 - UN / ID.: Ninguno
 - Grupo de embalaje: Ninguno

- **ICAO / IATA:**
 - Nombre propio del transporte: Ninguno
 - Clase de peligro: No está regulado.
 - Grupo de embalaje: Ninguno

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

Los requisitos reglamentarios están sujetos a cambio y pueden diferir de un lugar a otro. Es responsabilidad del comprador para asegurar que sus actividades cumplan con las regulaciones federales, estatales o leyes provinciales y locales. La siguiente información específica se hace con el propósito de cumplir con numerosas leyes federales, estatales o provinciales, y las leyes y reglamentos locales.

Ver otras secciones de información de salud y seguridad.

REGLAMENTOS EE. UU

Sara 313 del título III: No listado. TSCA Inventario: Listado

REGULACIONES ESTATALES

Propuesta de California 65: No Listado

INVENTARIOS INTERNACIONALES

Inventario Canadiense DSL: Listado

Lista UE EINECS: Los componentes están en cumplimiento y / o se enumeran. Japón (ECL): Listado

Australia (AICS): Listado

Inventario de sustancias químicas de Corea: Listado Filipinas (PICCS): No listado

Inventario existente de sustancias químicas de China: Listado.

16. OTRA INFORMACIÓN

Información en la etiqueta: Biopolímero Ingeo™ Código de producto: 4042D

Razón de la revisión: No aplicable Fecha de revisión: 04/01/2010

Fecha: 05/24/2011

Restricciones recomendadas: Ninguno

Preparado por: NatureWorks LLC Salud y Seguridad

2.1.2 DIOXANO

Ficha de datos de seguridad según 1907/2006/CE, Artículo 31 (REACH)

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

- **Identificador del producto**

- Nombre comercial: 1,4 – Dioxano, purísimo, estabilizado con 2.5 ppm de 2.6–Di-terc-butil-4-metilfenol (BHT)
- Número del artículo: DI1287
- Número de CAS: 123-91-1
- Número CE: 204-661-8
- Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados: No existen más datos relevantes disponibles.
- Utilización del producto/ de la elaboración: Reactivo de laboratorio

- **Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad**

- Fabricante/distribuidor: Scharlab, S.L.
C/Gato Pérez, 33. Pol. Ind. Mas d'en Cisa 08181 Sentment (Barcelona)
SPAIN
Tel: (+34) 93 745 64 00. FAX: (+34) 93 715 27 65
Email: scharlab@scharlab.com ; Internet Web Site: www.scharlab.com

Área de información: Departamento técnico

- **Teléfono de emergencia:** Scharlab, S.L. (+34) 93 715 18 11

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PROBLEMAS

- **Clasificación de la sustancia o de la mezcla**

- Clasificación con arreglo al Reglamento (CE) nº 1272/2008



GHS02 llamas

Flam. Líq. 2 H225 Líquido y vapores muy inflamables.



GHS08 peligro para la salud
Carc. 2 H351 Se sospecha que provoca cáncer



GHS07
Eye Irrit. 2 H319 Provoca irritación ocular grave. STOT SE 3 H335 Puede irritar las vías respiratorias.

- **Clasificación con arreglo a la Directiva 67/548/CEE o Directiva 1999/45/CE**



Xn; Nocivo



R40: Posibles efectos cancerígenos. Xi; Irritante
R36/37: Irrita los ojos y las vías respiratorias



F; Fácilmente inflamable

R11: Fácilmente inflamable.

R19-66: Puede formar peróxidos explosivos. La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel.

Carc. Cat. 3

- **Indicaciones adicionales sobre los riesgos para personas y el medio ambiente:** Debido al efecto desengrasante del disolvente, el contacto prolongado o repetido con la piel puede provocar una dermatitis (inflamación de la piel).

- **Elementos de la etiqueta**

- Etiquetado con arreglo al Reglamento (CE) nº1272/2008
La sustancia se ha clasificado y etiquetado de conformidad con el reglamento CLP
- Pictogramas de peligro:



- Palabra de advertencia: Peligro.
- Indicaciones de peligro
H225 Líquido y vapores muy inflamables.
H319 Provoca irritación ocular grave.
H351 Se sospecha que provoca cáncer. H335 Puede irritar las vías respiratorias.

- **Consejos de prudencia**

- P210 Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. –No fumar.
- P241 Utiliza un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante.
- P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.
- P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Guardar bajo llave. Eliminar contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

- **Datos adicionales**

- EUH019 Puede formar peróxidos explosivos
- EUH066 La explosión repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel.

- **Otros peligros**
- **Resultados de la valoración PBT y mPmB**
 - PBT: No aplicable
 - mPmB: No aplicable.

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

- **Caracterización química:** Sustancias
- **Denominación N.º CAS:** 123-91-1 1.4-dioxano
- **Número(s) de identificación**
 - Número CE: 204-661-8
 - Número de clasificación: 603-024-00-5

4. PRIMEROS AUXILIOS

- **Descripción de los primeros auxilios**
- En caso de inhalación del producto: Suministrar aire fresco. En caso de trastornos, consultar médico,
- En caso de contacto con la piel: Por regla general, el producto no irrita la piel.
- En caso de contacto con los ojos: Limpiar los ojos abiertos durante varios minutos con agua corriente.
- En caso de ingestión: Consultar un médico si los trastornos persisten.
 - **Indicaciones para el médico:**
 - Principales síntomas y efectos, agudos y retardados: No existen más datos relevantes disponibles.
 - **Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente:** No existen más datos relevantes disponibles.

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

- **Medios de extinción**
 - Sustancias extintoras apropiadas:
 - CO₂, polvo extintor o chorro de agua rociada. Combatir incendios mayores con chorro de agua rociada o espuma resistente al alcohol.
- **Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla:** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Recomendación para el personal de lucha contra incendios**
- **Equipo especial de protección:** No se requieren medidas especiales.

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

- **Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia**

Llevar puesto equipo de protección. Mantener alejadas las personas sin protección.

- **Precauciones relativas al medio ambiente**

Diluir con mucha agua

Evitar que penetre en la canalización/agua de superficie/aguas subterráneas.

- **Métodos y material de contención y de limpieza**

Quitar con material absorbente (arena, kieselgur, aglutinante de ácidos, aglutinante universal, aserrín).

Desechar el material contaminado como vertido según itel 13. Asegurar suficiente ventilación.

- **Referencia a otras secciones**

Ver capítulo 7 para más información sobre una manipulación segura. Ver capítulo 8 para más información sobre el equipo personal de protección. Para más información sobre cómo desechar el producto, ver capítulo 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- **Manipulación:**

- Precauciones para una manipulación segura. Abrir y manejar el recipiente con cuidado.
- Prevención de incendios y explosiones: Mantener alejadas las fuentes de encendido. No fumar.
- Tomar medidas contra las cargas electrostáticas.
- Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades.

- **Almacenamiento:**

- Exigencias con respecto al almacén y los recipientes: Almacenar en un lugar fresco.
- Normas en caso de un almacenamiento conjunto: No es necesario.
- Indicaciones adicionales sobre las condiciones de almacenamiento: Mantener el recipiente cerrado herméticamente. Almacenarlo en envases bien cerrados en un lugar fresco y seco.
- Usos específicos finales: No existen más datos relevantes disponibles.

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL

- **Instrucciones adicionales para el acondicionamiento de instalaciones técnicas:** Sin datos adicionales, ver punto 7.
- **Parámetros de control**
- **Componentes con valores límite admisibles que deben controlarse en el puesto de trabajo:** 123-91-1; 1.4-dioxano; LEP () Valor de larga duración: 73mg/m³, 20 ppm; VLI
- **Indicaciones adicionales:** Como base se han utilizado las listas vigentes en el momento de la elaboración.
- **Controles de la exposición**
 - Equipo de protección individual:
 - Medidas generales de protección e higiene:
Mantener alejado de alimentos, bebidas y alimentos para animales.
Quitarse de inmediato la ropa ensuciada o impregnada.
Lavarse las manos antes de las pausas o impregnada. Evitar el contacto con los ojos.
Evitar el contacto con los ojos y la piel.
 - Protección respiratoria: Si la exposición va a ser breve o de poca intensidad, colocarse una máscara respiratoria. Para una exposición más intensa o de mayor duración, usar un aparato de respiración autónomo.
 - Protección de manos:



Guantes de protección

El material del guante deberá ser impermeable y resistente al producto/ sustancia / preparado. Ante la ausencia de test específicos, no se puede recomendar ningún material específico para guantes de protección contra el producto / preparado / mezcla de sustancias químicas.

Selección del material de los guantes en función de los tiempos de rotura, grado de permeabilidad y degradación.

- Material de los guantes

La elección del guante adecuado no depende únicamente del material, sino también de otras características de calidad, que pueden variar de un fabricante a otro.

- Tiempo de penetración del material de los guantes
El tiempo de resistencia a la penetración exacto deberá ser pedido al fabricante de los guantes. Este tiempo debe ser respetado.
- Protección de ojos:



Gafas de protección herméticas

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

- **Información sobre propiedades físicas y químicas básicas**
- **Datos generales**
 - Aspecto: Forma: Líquido Color: Incoloro
 - Olor: Etéreo.
 - Umbral olfativo: No determinado.
 - Valor pH: No determinado.
- **Cambio de estado:**
 - Punto de fusión: 11.8 °C
 - Punto de ebullición: 101.3 °C
- **Punto de inflamación:** 11 °C
- **Inflamabilidad (sólido, gaseiforme):** No aplicable.
- **Temperatura de ignición:** 375 °C.
- **Temperatura de descomposición:** No determinado.
- **Autoinflamabilidad:** No determinado.
- **Peligro de explosión:** Puede formar peróxidos explosivos
- **Límites de explosión:** Inferior: 1.9 vol%; Superior: 22.5 vol %.
- **Presión de vapor a 136°C:** 41 hPa
- **Densidad a 20 °C:** 1.0336 g/cm³
- **Densidad relativa:** No determinado.
- **Densidad de vapor:** No determinado.
- **Velocidad de evaporación:** No determinado.
- **Solubilidad en/ miscibilidad con agua a 20 °C:** Completamente mezclable.

- **Coeficiente de reparto (n-octanol/agua):** No determinado.
- **Viscosidad:** Dinámica a 25^oC: 1.2 mPas; Cinemática: No determinado.
- **Información adicional:** No existen más datos relevantes disponibles.

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

- **Reactividad**
- **Estabilidad química**
- **Descomposición térmica/ condiciones que deben evitarse:** No se descompone al emplearse adecuadamente.
- **Posibilidad de reacciones peligrosas.** No se conocen reacciones peligrosas
- **Condiciones que deben evitarse** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Materiales incompatibles:** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Productos de descomposición peligrosos:** No se conocen productos de descomposición peligrosos.

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

- **Información sobre los efectos toxicológicos**
- **Toxicidad aguda:**
 - Valores LD/LC50 (dosis letal / dosis letal= 50%) relevantes para la clasificación:
Oral (LD50) 5700mg/kg (ratón) Dermal (LD50) 7600 mg/kg (conejo)
Inhalatorio (LC50/4 h) 46 mg/l (rata)
- **Efecto estimulante primario:**
 - En la piel: No produce irritaciones.
 - En el ojo: Produce irritaciones.
 - Sensibilización: No se conoce ningún efecto sensibilizante.
 - Efectos CMR (carcinogenicidad, mutagenicidad y toxicidad para la reproducción)

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

- **Toxicidad**
 - Toxicidad acuática: No existen más datos relevantes disponibles.
 - Persistencia y degradabilidad: No existen más datos relevantes disponibles.
- **Comportamiento en sistemas ecológicos:**
 - Potencial de bioacumulación: No existen más datos relevantes disponibles.

- Movilidad en el suelo: No existen más datos relevantes disponibles.
- **Indicaciones medioambientales adicionales:**
 - Indicaciones generales:
Nivel de riesgo para el agua 2 (autoclasiicación): peligroso para el agua.
No dejar que se infiltre en aguas subterráneas, aguas superficiales o alcantarillados. Una cantidad mínima vertida en el subsuelo ya representa un peligro para el agua potable.
- **Resultados de la valoración PBT y mPmB**
 - PBT: No aplicable.
 - mPmB: No aplicable.
 - Otros efectos adversos: No existen más datos relevantes disponibles.

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

- **Métodos para el tratamiento de residuos**
 - Recomendación: No debe desecharse con la basura doméstica. No debe llegar al alcantarillado.
- **Embalajes sin limpiar:**
 - Recomendación: Eliminar conforme a las disposiciones oficiales.
 - Producto de limpieza recomendado: Agua, eventualmente añadiendo productos de limpieza.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

- **Número UN**
- **ADR, IMDG, IATA UN1165**
- **Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas**
 - ADR 1165 DIOXANO
 - IMDG, IATA DIOXANE
 - Clase(s) de peligro para el transporte

- ADR



- clase 3 Líquidos inflamables
- etiqueta 3

- ADR, IMDG, IATA II

- **Peligros para el medio ambiente:**
 - Contaminante marino: No
 - Precauciones particulares para los usuarios Atención: Líquidos inflamables.
 - Número Kemler: 33
 - Número EMS: F-E, S-D
 - Transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio Marpol 73/78 y del Código IBC: No aplicable.

- **Transporte/datos adicionales:**
 - ADR
 - Cantidades limitadas (LQ) 1L
 - Categoría de transporte 2
 - Código de restricción del túnel D/E
 - “Reglamentación Modelo” de la UNECE: UN1165, DIOXANO,3, II

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

- Evaluación de la seguridad química: Una evaluación de la seguridad química no se ha llevado a cabo.

2.2 Especificaciones técnicas de los equipos

Para poder llevar a cabo el proyecto, han sido necesarios muchos aparatos que han facilitado y permitido desarrollar todos los análisis necesarios para la caracterización de las muestras.

Todos los equipos cumplen con lo necesario en cuanto a su fabricación y ensayos, según la última edición de la norma UNE, publicada por AENOR, referente a cada elemento o material que se especifica. Como no hay una norma UNE para un equipo concreto, se aplica la norma europea más restrictiva.

En las tablas de a continuación, se muestran las especificaciones técnicas de cada instrumento:

1. Agitador magnético con calefacción



Tabla de especificaciones 1 Agitador magnético con calefacción

MODELO	Ovan – Multimix D 5p (MMH50E)
REFERENCIA	10000-01037
Nº DE PLAZAS	5

Agitación magnética	
VOLUMEN MÁX. (L) (POR PLAZA)	2

POTENCIA (W) (POR PLAZA)	9
RANGO DE VELOCIDAD (RPM)	200-1200
RESOLUCIÓN (RPM)	100
Calefacción	
POTENCIA CALEFACTORA (W) (POR PLAZA)	250
RANGO DE TEMPERATURA (°C)	30-400
RESOLUCIÓN (°C)	10
Datos generales	
MATERIAL PLATO	Aluminio pulido
DIMENSIONES PLATO (mm) (POR PLAZA)	100x100
DIMENSIONES (mm)	360x445x90
PESO	6
PROTECCIÓN IP	IP53

2. Desecador termostático al vacío



Tabla de especificaciones 2 Desecador termostático al vacío

MODELO	J.P. Selecta - Vacuo - Temp
REFERENCIA	4000474
VACÍO MÁXIMO	5
DIÁMETRO PLACA CALEFACTORA (cm)	23,5
DIMENSIONES (cm)	17x28x34
PESO (kg)	9
CONSUMO (W)	540
TEMPERATURAS REGULABLES (°C)	5-170
ESTABILIDAD (°C)	±1
RESOLUCIÓN (°C)	1
TIEMPO	1' hasta 999' en continuo

3. Equipo DSC



Tabla de especificaciones 3 Equipo DSC

MODELO	Perkin Elmer-DSC 8000
RANGO DE TEMPERATURA (°C)	-180 - 750
VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO (°C/min)	0,01 - 300
OPCIÓN ALTA PRESIÓN (psi)	600
REFRIGERACIÓN	Nitrógeno líquido

4. Balanza de precisión



Tabla de especificaciones 5 Balanza de precisión

MODELO	Mettler Toledo – AX205DeltaRange
RANGO DE TEMPERATURA (K)	0,01 mg/ 0,1mg
VOLUMEN MUESTRA (µL)	81,0 g/ 220,0 g

5. Equipo TGA



Tabla de especificaciones 4 Equipo TGA

MODELO	Mettler Toledo – DSC/TGA 2
RANGO DE TEMPERATURA (K)	RT hasta 1873
PRECISIÓN (K)	±0,3
TIEMPO DE CALENTAMIENTO (min)	10 (RT a 1873 K)
TIEMPO DE ENFRIAMIENTO (min)	27 (1873 a 373 K)
TIEMPO DE ENFRIAMIENTO CON HIELO (min)	≤ 13 (1373 a 373 K)
VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO (K/min)	100
VELOCIDAD DE ENFRIAMIENTO	-20(≥ 473 K)
VOLUMEN MUESTRA (μL)	≤ 900

6. Equipo DMA

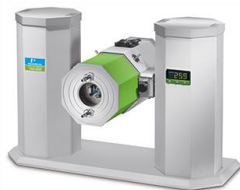


Tabla de especificaciones 5 Equipo DMA

MODELO	Perkin Elmer DMA 8000
RANGO DE TEMPERATURA (°C)	-190 a 400
RANGO DINÁMICO (Hz)	0 a 600
TIPO DE TECNOLOGÍA	Análisis térmico

3. Pliego de prescripciones de gestión de residuos

3.1 Gestión de residuos

El Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT), como centro en el que se trabaja con productos químicos y biológicos, dispone de un sistema de gestión de residuos. Este sistema está basado en la información proporcionada por el Área de Medio Ambiente de la UPV y cumple con su Normativa respecto a Residuos Peligrosos, que a su vez está regulada por Normativa Estatal y Autonómica. (“Ley 10/1998, de 21 de abril, de residuos”, “Ley 10/2000, de 12 de diciembre, de residuos de la Comunidad Valenciana”, “Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, de 14 de mayo, básica de residuos tóxicos y peligrosos”, “Real Decreto 952/1997, de 20 de junio, así como el resto de normativa aplicable”). La Oficina Verde del Área de Medio Ambiente se encarga de gestionar la recogida y posterior tratamiento de residuos generados en las instalaciones del CBIT, así como de proporcionar los recipientes y etiquetas para la identificación de los residuos, según la clasificación de los mismos.

Los residuos generados en el CBIT pueden dividirse en residuos no peligrosos y residuos peligrosos. Se define como residuo peligroso aquel que, debido a su cantidad,

concentración o características físicas, químicas y/o biológicas puede suponer una amenaza para la salud o el medioambiente cuando se manipula, almacena, elimina o transporta incorrectamente.

3.1.1 Normas básicas para gestión de residuos no peligrosos

Se dispone de los siguientes contenedores para la gestión de residuos no peligrosos:

- Papeleras azules: para los residuos de papel y cartón. Las cajas de cartón se deben dejar totalmente desmontadas a la entrada, para su retirada por el servicio de limpieza.
- Papeleras amarillas: para envases ligeros de plástico (botellas, bolsas, bandejas de corcho blanco), envases metálicos (latas, bandejas de aluminio) y envases tipo brick.
- Papeleras negras: para el reciclado de residuos orgánicos.
- Cajas verdes de Offiservice: los cartuchos de las impresoras, tóner de la fotocopiadora y fax, se reciclan en las cajas verdes de Offiservice que están en el Despacho 1 y hall entrada.

3.1.2 Normas básicas para gestión de residuos peligrosos

Para la gestión de los residuos peligrosos cada laboratorio dispone, en función de la actividad que se realiza en ellos, de los correspondientes bidones de residuos. Éstos se dejan en el laboratorio hasta su llenado y, posteriormente, se almacenan hasta su recogida.

Todo recipiente que se utilice para almacenar un residuo peligroso debe etiquetarse correctamente en el momento que se utiliza por primera vez, nunca cuando se encuentra lleno. Para ello se dispone de dos etiquetas de identificación; una etiqueta específica indicando el nombre exacto del residuo y una etiqueta, proporcionada por el Área de Medio Ambiente, con el grupo general al que pertenece el residuo y los pictogramas correspondientes, y que debe rellenarse indicando el nombre del centro, edificio donde se ubica, responsable, teléfono de contacto y fecha de envasado.

Como normas generales para el tratamiento de los residuos peligrosos se establece que:

- Está totalmente prohibido tirar residuos de disoluciones o reactivos químicos o biológicos por el fregadero. Solamente las disoluciones acuosas conteniendo sólo ácidos o bases y ningún metal pueden desecharse por el fregadero, siempre y cuando el pH esté comprendido entre 5.5 y 11.0.
- Las disoluciones generadas por el lavado de recipientes que hayan contenido reactivos químicos o biológicos son consideradas también como residuos.
- Los sobrantes de los productos químicos utilizados no se devuelven nunca a los frascos de origen, se vierte en un vaso de precipitados la cantidad aproximada a utilizar y el sobrante se gestiona como residuo.
- Todo envase que haya contenido un reactivo es un residuo y se dejará en el contenedor correspondiente para que el técnico del laboratorio lo gestione.
- Cada residuo generado debe almacenarse según el grupo al que corresponda y nunca deben mezclarse residuos incompatibles en un mismo contenedor. Los productos tóxicos no deben estar próximos a los comburentes y a su vez deben estar alejados de inflamables y peróxidos.
- Es conveniente no llenar más de $2/3$ del volumen de los recipientes que contengan los residuos, ya que pueden generarse vapores.
- Los guantes de laboratorio, si están contaminados con restos de productos químicos y/o monómeros, se reciclan en los bidones etiquetados específicamente para este uso. Si no están contaminados con restos de reactivos se dejan en las papeleras negras (nunca en las papeleras amarillas para plástico).
- Los recipientes e los que se almacenen los residuos deben mantenerse herméticamente cerrados en todo momento, excepto durante el trasvase de residuos. Si se usa un embudo este debe

retirarse tras el trasvase y se debe dejar sujeto a la tapa del contenedor de residuos para posteriores vertidos.

- Los restos de ácido o base y sus diluciones se neutralizarán inmediatamente después de su uso y en caso de que los productos obtenidos sean tóxicos se gestionarán en los bidones correspondientes.
- En el laboratorio existen recipientes específicos para los residuos punzantes, tales como agujas y cuchillas.
- Todo residuo que haya estado en contacto con monómeros debe introducirse en una bolsa zip perfectamente cerrada antes de dejarlo en el bidón correspondiente.
- Los bidones con residuos de monómeros solamente pueden abrirse debajo de una campana de extracción para el vertido de los residuos.
- Los disolventes se gestionan como disolventes halogenados y no halogenados excepto: acetona de lavado (con PMMA o PEMA disuelto) y etanol de lavado (disolventes no halogenados).
- El cristal de laboratorio roto o contaminado nunca se tirará a la basura, debido al elevado riesgo de cortes del personal de Limpieza. Para ello, se dispone de un bidón específico para este uso.
- Cualquier otro reactivo o mezcla consultar su gestión al Técnico de Laboratorio o al Responsable de Gestión Medioambiental, con anterioridad a su producción, por si es necesario hacer consultas sobre su gestión a la Oficina Verde.

Presupuesto

En el presente apartado se adjunta una aproximación del presupuesto utilizado durante la realización del TFG. Se detalla tanto el uso de equipos, materiales e instrumental utilizado, así como el coste de la mano de obra. Se considera un periodo de vida de los equipos de 5 años.

1. Elementos de protección individual

En este apartado dentro del presupuesto nos encontramos todos los elementos de protección individual utilizados durante la preparación de las disoluciones, así como la ejecución de los diversos ensayos.

	Designación	Precio (€)	Cantidad	Total (€)
Elementos de protección individual (EPI)	Bata de laboratorio	13,25	1	13,25
	Gafas de seguridad	9,79	1	9,79
	Guantes de nitrilo	0,06	50	3,30
	Guantes de látex	0,03	150	4,50
	Mascarilla de gases	17,99	1	17,99
	Mascarilla antipartículas	17,92	1	17,92
TOTAL				66,75

2. Reactivos

En este apartado dentro del presupuesto nos encontramos todos los reactivos utilizados para la elaboración de los *films*, así como para la realización del ensayo de calorimetría.

	Designación	Precio	Cantidad	Total (€)
Reactivos	Dioxano	97,10€ / 250 ml.	150,00 ml.	58,26
	PLLA	8€ / 500 g.	50,00 g.	0,80
	Agua desionizada	64,50€ / 25l.	0,20 l.	0,52
	Cloruro de zinc	77,90€ / 5g.	2,00 g.	31,16
	Buffer tris	80,90€ / 1l.	0,03 l.	2,02
	Zincon	45,20€ / 1g.	0,02 g.	0,77
	Hidróxido de sodio	21,30€ / 100g.	1,50 g.	0,32
TOTAL				93,85

3. Materiales de laboratorio

En este apartado dentro del presupuesto nos encontramos todos los materiales utilizados durante el proceso de elaboración de los *films* durante la preparación previa de los ensayos de DSC, TGA y DMA, y durante la ejecución del ensayo de calorimetría.

	Designación	Precio (€)	Cantidad	Total (€)
Material de laboratorio	Imán agitador 6x15 mm	1,43	3	4,29
	Imán agitador 8x30 mm	2,09	2	4,18
	Placa petri de vidrio Ø90mm	5,74	4	22,96
	Troquel Ø8mm	6,79	1	6,79
	Martillo de latón	31,95	1	31,95
	Gradilla pequeña	12,64	3	37,92
	Tubos eppendorf	0,03	576	17,28
	Micropipeta de volumen	91,96	3	275,88
	Frasco graduado ISO 50ml	8,72	12	104,66
	Placa multipocillo P24	93,00	1	93,00
	Placa multipocillo P96	89,00	2	178,00
	Hojas de papel de bancada	2,00	15	30,00
	Uds. capsulas DSC	1,30	18	23,40
	Parafilm (m)	0,78	0,5	0,39
	Bolsas zip	0,01	30	0,30
	Cucharilla con espátula	0,50	2	1,00
	Probeta graduada de 10ml	3,18	2	6,36
	Tubo de ensayo 16x160mm	0,24	3	0,72
TOTAL				839,08

4. Equipos

En este apartado dentro del presupuesto nos encontramos todos los equipos utilizados para la ejecución de cada uno de los distintos ensayos realizados a lo largo de la elaboración del trabajo de fin de grado.

	Designación	Precio (€)	Tiempo (h)	Total (€)
Equipos	DSC 8000	50.000,00	10	11,42
	TGA	80.000,00	12	21,92
	Desecador vacuo-temp	1.000,00	192	4,38
	Balanza de precisión	6.000,00	4	0,55
	Agitador magnético	16,73	108	0,04
	Vortex	180,29	1	0,01
	DMA 8000	70.000	20	31,96
TOTAL				70,28

5. Mano de obra

En este apartado dentro del presupuesto nos encontramos el coste aproximado de la mano de obra de un investigador durante la realización de todos los trabajos realizados en la elaboración, ejecución y análisis de resultados de las distintas técnicas utilizadas durante el desarrollo del TFG.

	Designación	Precio (€/año)	Tiempo (días)	Total (€)
Mano de obra	Salario anual colaborador de investigación	21.837,20	180	10.769,04
TOTAL				10.769,04

6. Presupuesto total

	Total (€)
EPI's	66,75
Reactivos	93,85
Material de laboratorio	839,08
Equipos	70,28
Mano de obra	10.769,04
TOTAL	11.839,00

El presupuesto total de todas las partidas que componen este TFG representan un coste total de once mil ochocientos treinta y nueve euros (**11.839,00€**).