



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES MODIFICADOS PARA REGENERACIÓN DE PIEL

AUTOR: SANTIAGO VAQUÉ AURA

TUTORA: GLORIA GALLEGO FERRER

COTUTOR: JOAQUÍN RÓDENAS ROCHINA

Curso Académico: 2016-17

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora Dra. Gloria Gallego García y a mi cotutor Dr. Joaquín Ródenas Rochina por brindarme la oportunidad de realizar el trabajo fin de grado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT). Estoy muy agradecido por todo lo que me han enseñado ya que sé que nunca lo olvidaré, también por las ganas que ponen en la enseñanza y el aprendizaje de cualquier alumno. También me gustaría agradecerles por todos sus consejos e indicaciones y por la atención, preocupación e interés mostrado.

Me gustaría agradecer también a todos los miembros del CBIT por todas las ayudas que me han prestado en el laboratorio y por su amabilidad y dedicación. Quisiera agradecer a la Dra. Carmen María Antolinos Turpín no sólo por su enseñanza, sino también por el interés y las ganas que muestra en cualquier alumno.

También quería dar las gracias a mis compañeros que han estado y trabajado conmigo en el CBIT, haciendo especial mención a Jessica, Alejandro, Sofía y Laura, ellos han estado siempre apoyándome y haciéndome sacar siempre una sonrisa en los momentos más necesarios.

Por otra parte, quisiera agradecer infinitamente a María Clavijo y Daniela Lo Guzzo por haberme acompañado durante todos estos años de grado. Una carrera no se puede terminar sin la ayuda y el apoyo mutuo y constante de tus compañeros; ellas han sido las que realmente me han conocido y han sabido estar siempre presentes.

Para terminar, me gustaría agradecer ante todo al pilar fundamental de mi vida, a mi familia. Estoy convencido de que sin ellos jamás habría sido posible la realización de este trabajo. Quisiera agradecer concretamente y de corazón a mis padres por toda su preocupación, por entender todas las cosas que me pasan, por motivarme siempre y fundamentalmente por el apoyo incondicional que me aportan cada día, ellos me aportan la energía y la fuerza para conseguir lo que me propongo.

RESUMEN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y está formado por tres capas: la epidermis, la dermis y por la hipodermis. Las quemaduras producidas en la piel afectan directamente a estas capas, aumentando su gravedad en función de la profundidad alcanzada.

Actualmente, uno de los principales problemas reside en la búsqueda de estrategias efectivas como apoyo en el proceso de curación de estas lesiones. Una de estas estrategias ha permitido desarrollar sustitutos cutáneos, sin embargo, estos injertos actuales presentan ciertas limitaciones, como la falta de estructuras secundarias de la piel (folículos pilosos y glándulas sudoríparas) y la incapacidad de impedir la contracción del implante mediado por los fibroblastos. Las terapias desarrolladas desde la ingeniería tisular, se centran en el desarrollo de membranas formadas por células encapsuladas en hidrogeles para regenerar la zona lesionada.

Para hacer frente a este problema, en el presente Trabajo Fin de Grado, se ha desarrollado un constructo hidrogel-membrana de fibras como futuro soporte para la regeneración de piel. Para ello se ha sintetizado y caracterizado un hidrogel de ácido hialurónico modificando sus cadenas con tiramina para el entrecruzamiento. El ácido hialurónico presenta una gran biocompatibilidad cuando es injertado en el organismo humano debido a la abundancia de este compuesto en la matriz extracelular. Por ello y por sus extensas propiedades antiadhesivas y biodegradables ejerce de excelente apoyo para las células presentes en las capas cutáneas afectadas por quemaduras y amenazadas por la entrada de microorganismos.

Para aumentar las propiedades mecánicas del hidrogel se ha fabricado una membrana polimérica de refuerzo y se ha ensamblado al hidrogel, para evitar su fraccionamiento y contracción en el organismo. Esta membrana porosa presenta además la perspicacia de estar formada por fibras. En las fibras se ha introducido un medicamento mediante técnicas de emulsión, capaz de liberarse en la zona dañada. De este modo, se aportan propiedades antibacterianas en la etapa de inflamación de la herida.

Palabras clave: hidrogeles, fibras, membranas, sistema de liberación de fármaco, ingeniería tisular, quemaduras, regeneración de piel.

RESUM

La pell és l'òrgan més extens del cos i està format per tres capes: l'epidermis, la dermis i per la hipodermis. Les cremades produïdes a la pell afecten directament aquestes capes, augmentant la seua gravetat en funció de la profunditat de la cremada.

Actualment, un dels principals problemes resideix en la busca d'estratègies efectives com a suport en el procés de curació de les lesions. Una d'aquestes estratègies ha permès desenvolupar substituents cutanis, no obstant això, els empelts actuals presenten certes limitacions, com la falta d'estructures secundàries de la pell (fol·licles pilosos i glàndules sudorípares) i la incapacitat d'impedir la contracció de l'implant mediat pels fibroblastos. Les teràpies desenvolupades des de l'enginyeria tissular, es centren en el desenvolupament de membranes formades per cèl·lules encapsulades en hidrogeles per a regenerar la zona lesionada.

Per a fer front a aquest problema, en el present Treball Fi de Grau, s'ha desenvolupat un constructe hidrogel-membrana de fibres com futur suport per a la regeneració de pell. Per aconseguir això s'ha sintetitzat i caracteritzat un hidrogel d'àcid hialurònic modificant les seues cadenes amb tiramina per a l'entrecruament. L'àcid hialurònic presenta una gran biocompatibilitat quan és empeltat dins de l'organisme humà a causa de l'abundància d'aquest compost en la matriu extracel·lular. Per això i per les seues extenses propietats antiadhesives i biodegradables exerceix d'excel·lent suport per a les cèl·lules presents en les capes cutànies afectades per cremades i amenaçades per l'entrada de microorganismes.

Per augmentar les propietats mecàniques de l'hidrogel s'ha fabricat una membrana polimèrica de reforç i s'ha acoblat amb l'hidrogel, per evitar el seu fraccionament i contracció en l'organisme. Aquesta membrana porosa presenta a més la perspicàcia d'estar formada per fibres. A les fibres s'ha introduït un medicament mitjançant tècniques d'emulsió, capaç d'alliberar-se a la zona danyada. D'aquesta manera, s'aporten propietats antibacterianes a l'etapa d'inflamació de la ferida.

Paraules clau: hidrogeles, fibres, membranes, sistema d'alliberament de fàrmac, enginyeria tissular, cremades, regeneració de pell.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the body and consists of three layers: the epidermis, the dermis and the hypodermis. Burns produced on the skin directly affect these layers, increasing its severity depending on the depth reached.

Currently, one of the main problems is the search for effective strategies as support in the healing process of these injuries. One of these strategies has allowed the development of cutaneous substitutes; however, these current grafts present certain limitations, such as the lack of secondary structures of the skin (hair follicles and sweat glands) and the inability to prevent the contraction of the implant mediated by fibroblast. The therapies developed from tissue engineering, focus on the development of membranes formed by cells encapsulated in hydrogels to regenerate the injured area.

To deal with this problem, in the present Bachelor's Thesis, a construct of hydrogel-membrane has been developed as future support for skin regeneration. For this, a hyaluronic acid hydrogel has been synthesized and characterized by modifying its chains with tyramine in order to make the cross-linking possible. Hyaluronic acid has a high biocompatibility when it is grafted into the human organism due to the abundance of this compound in the extracellular matrix. For this reason, and because of its extensive anti-adhesive and biodegradable properties, it provides excellent support for the cells present in the skin layers affected by burns and threatened by the entry of microorganisms.

To increase the mechanical properties of the hydrogel, a reinforcing polymeric membrane has been fabricated and assembled with the hydrogel to prevent its fractionation and contraction in the organism. This porous membrane has also the insight of being formed by fibers. In the fibers, a medicament capable of being released once introduced into the damaged area had been introduced. In this way, antibacterial properties are provided in the stage of wound inflammation.

Key words: hydrogels, fibers, membranes, drug delivery system, tissue engineering, burns, skin regeneration

ÍNDICE GENERAL

DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

- Memoria
- Presupuesto

ÍNDICE GENERAL

DOCUMENTO I: MEMORIA

1. MOTIVACIÓN.....	7
2. JUSTIFICACIÓN.....	8
3. OBJETIVOS	9
4. ANTECEDENTES	11
5. NORMATIVA	33
6. METODOLOGÍA.....	34
7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	62
8. CONCLUSIONES	67
9. BIBLIOGRAFÍA.....	88
ANEXOS	91

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO.....	107
2. CUADRO MANO DE OBRA	107
3. CUADRO MAQUINARIA	108
4. CUADRO MATERIALES	109
5. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS	111
6. PRESUPUESTOS PARCIALES.....	116
7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN.....	118

DOCUMENTO 1:

MEMORIA

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. MOTIVACIÓN	7
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVOS	9
4. ANTECEDENTES	11
4.1 BIOMATERIALES E INGENIERÍA TISULAR	12
4.2 FUNCIONES DE LA PIEL	13
4.3 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL.....	14
4.3.1 La epidermis	16
4.3.2 La dermis	19
4.3.3 La hipodermis	20
4.4 GRAVEDAD DE LAS QUEMADURAS EN LA PIEL	20
4.5 SUSTITUTOS DE LA PIEL	23
4.6 PAPEL DE LOS MATERIALES BIODEGRADABLES EN LA CURACIÓN DE QUEMADURAS.	23
4.7 HIDROGELES INYECTABLES.....	25
4.7.1 Hidrogeles de ácido hialurónico modificado con tiramina	25
4.7.2 Sistema de liberación de fármacos a partir de un hidrogel	29
4.8 MEMBRANAS PARA ESTABILIDAD MÉCANICA.	31
5. NORMATIVA	33
6. METODOLOGÍA	34
6.1 UTENSILIOS EMPLEADOS A NIVEL DE LABORATORIO	34
6.2 MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS.....	35
6.3 REACTIVOS EMPLEADOS	36
6.4 MONTAJE Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	37
6.4.1 Síntesis del ácido hialurónico modificado con tiramina.....	38
6.4.2 Procedimiento para la cuantificación del grado de sustitución de la tiramina en el ácido hialurónico.....	40
6.4.3 Ensayo de reometría	40
6.4.4 Procedimiento para la realización de la emulsión.	41
6.4.5 Preparación de los films de control por <i>solvent casting</i>	46

6.4.6 Preparación de las membranas mediante <i>electrospinning</i>	47
6.4.7 Morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	52
6.4.8 Procedimiento para el entrecruzamiento del hidrogel conteniendo las membranas de <i>electrospinning</i> y <i>solvent casting</i>	53
6.4.9 Sistema de liberación de la tetraciclina del hidrogel	57
6.4.10 Ensayo de resistencia al desgarro	59
6.5 ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	61
7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	62
7.1 MORFOLOGÍA DE LAS MEMBRANAS DE <i>ELECTROSPINNING</i> Y DE LOS FILMS DE <i>SOLVENT CASTING</i>	62
7.2 GRADO DE SUSTITUCIÓN DE LA TIRAMINA EN EL ÁCIDO HIALURÓNICO.	66
7.3 CARACTERIZACIÓN DE LA GELIFICACIÓN MEDIANTE REOMETRÍA.....	68
7.4 ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DEL FÁRMACO	74
7.5 ESTUDIO DEL ENSAYO DE RESISTENCIA AL DESGARRO.....	80
8. CONCLUSIONES.....	87
9. BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXO I: IMÁGENES DE LOS EQUIPO EMPLEADOS EN EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	91
ANEXO II: OBTENCIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE SUSTITUCIÓN.	96
ANEXO III: ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE LA TETRACICLINA.....	98

1. MOTIVACIÓN

El empeño y la dedicación empleados en la realización de este trabajo son frutos del interés mostrado desde el primer momento en el tema tratado y en el campo que el tema implica. Desde el primer minuto del comienzo de mi trabajo me ha apasionado la idea de poder aportar algo o por lo menos contribuir mínimamente en la mejora de la calidad de vida de ciertas personas. La combinación de materiales poliméricos para su aplicación en partes del cuerpo humano es un tema que desde el comienzo de mi carrera ha despertado mi atención y considero que al tratarse de temas relativamente nuevos tiene un futuro aún por desarrollar. Por ello decidí realizar mi Trabajo Final de Grado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) para estar rodeado en todo momento de grandes profesionales del tema y aprender de ellos lo máximo posible, siempre sin perder la motivación con la que empecé, ya que considero que la pieza fundamental para aprender cosas nuevas es la motivación personal que uno posee a la hora de hacer las cosas.

Otra de las razones que me instaron a realizar un trabajo como el presente reside en que encontré la oportunidad de revivir conceptos teóricos y prácticas fundamentales de asignaturas realizadas durante el grado de Ingeniería Química. Estas asignaturas fueron: Estadística, Química, Química Orgánica, Proyectos en Ingeniería Química, Ciencia de Materiales e Ingeniería de Polímeros y Biopolímeros. He tenido la oportunidad no solo de volver a emplear las técnicas vistas en estas asignaturas aplicadas a un caso práctico, sino de consolidarlas y entender realmente su importancia, utilidad y aplicación para el trabajo profesional.

Sin embargo, mi mayor motivación fueron mis ganas e ímpetu por aprender el máximo de cosas durante este periodo de tiempo y por desarrollar las competencias adquiridas en el grado. Mi intención fue siempre la de aprender cosas nuevas, cosas que me puedan servir en un futuro y que permitan hacerme madurar académicamente. Para lograr estos objetivos, he procurado en todo momento desempeñar las tareas de la manera más eficaz posible y resolver las dudas que me surgían de la manera más lógica y eficaz posible. También he debatido y consultado mis propios razonamientos en los problemas surgidos, proponiendo nuevas alternativas o posibles causas de errores cometidos, esto ha permitido mejorar y desarrollar mi pensamiento crítico.

2. JUSTIFICACIÓN

El avance de la medicina ha permitido el descubrimiento y la mejora de los biomateriales. A día de hoy, un elevado número de biomateriales se emplea con fines clínicos y mejoran la vida de los pacientes, aportándoles una calidad de vida más sostenida. Sin embargo, el elevado número de polímeros existentes, la infinidad de propiedades que presentan cada uno de ellos y sus múltiples posibilidades de tratamiento y combinación abre muchos más campos de investigación destinados a encontrar y sintetizar el material que se adapte mejor al órgano o tejido que se pretende regenerar.

Para la regeneración de las quemaduras en la piel se ha escogido como material a sintetizar un hidrogel de ácido hialurónico modificado con tiramina para su entrecruzamiento. El hidrogel se refuerza con una membrana sintetizada mediante la técnica del *electrospinning* (en castellano: electrohilado) cargada con tetraciclina por técnicas de emulsión para su liberación en la zona dañada. El hidrogel es inyectable, y permite la encapsulación de células al reticular, por ello, proporcionará el apoyo funcional en el proceso de cicatrización de quemaduras de piel mediante la proliferación y secreción de matriz extracelular por las células. La membrana de refuerzo evitará la contracción del hidrogel durante el proceso de curado y permitirá la liberación del medicamento en ella encapsulado para minimizar la infección bacteriana. Se ha escogido un polímero hidrófobo biodegradable para fabricar la membrana de fibras y, por tanto, ha sido necesario emulsionar la disolución acuosa del medicamento para incorporarla uniformemente en las fibras. Se pretende obtener una liberación controlada del antibiótico, acompañada con la degradación hidrolítica del polímero hidrófobo en el que está encapsulada.

La elección de hidrogeles basados en el ácido hialurónico se debe a que es uno de los componentes principales que están presentes en la matriz extracelular de la piel. Por ello y, al ser un polímero natural, aportará mayor biocompatibilidad en su aplicación en la piel. También el ácido hialurónico presenta unas excelentes propiedades antibacterianas y antiadhesivas y es un hidrogel capaz de reticular in situ en el lugar de la lesión adaptándose así a la forma de la herida.

Por su parte las membranas poliméricas cargadas con un medicamento por la técnica de emulsión y *electrospinning* es un método muy efectivo a la hora de la liberación del fármaco. Con este procedimiento se busca ayudar en la cicatrización de las quemaduras de piel y en la eliminación de bacterias. Con la utilización de las membranas fibrosas se busca también la mejora de la estabilidad y las propiedades mecánicas del hidrogel gracias al refuerzo aportado por las fibras electrohiladas.

3. OBJETIVOS

Las quemaduras producidas en la piel son las principales responsables de la descomposición del tejido dermatológico del ser humano y son causadas mayormente por el contacto de la piel con calor o con corriente eléctrica. Hoy en día, un elevado número de la población mundial se ven afectados por estas quemaduras, distinguiendo desde quemaduras superficiales o de primer grado, hasta las más nocivas conocidas como quemaduras de tercer grado.

La gravedad de este tipo de lesiones es extremadamente significativa, una quemadura de tercer grado puede provocar en la victima no solo cicatrices irreversibles e insensibilidad debido a la disfuncionalidad de los nervios cercanos, sino también provocar, en los casos más extremos, alteraciones respiratorias y cardiovasculares.

Una posible solución a esta problemática recae en la ingeniería tisular, cuyo objetivo es la regeneración de la parte dañada del organismo humano. En relación a este ámbito y concretamente a las lesiones cutáneas, la medicina regenerativa busca el uso de biomateriales inyectables que aporten un apoyo funcional que mimetice a la matriz extracelular de la piel y que aporten un soporte a las células dañadas de la piel mediante la liberación de fármacos a la zona sensible de la herida.

En base a esto, el objetivo principal de este trabajo es la síntesis y la caracterización de un hidrogel biocompatible y biodegradable que sirva como soporte en la regeneración de las heridas de la piel producidas por quemaduras y que emule en la medida de lo posible a la matriz extracelular. Este biomaterial estará formado por de ácido hialurónico (HA) modificado con tiramina (Tyr) y poseerá la propiedad de estar reforzado mediante una membrana compuesta por una fase polimérica de ácido poliláctico (PLLA) y producida mediante la técnica de *electrospinning*. Las fibras que forman esta membrana contendrán en el interior de sus poros un antibiótico, la tetraciclina, para su liberación en la zona dañada garantizando así un apoyo complementario para las células durante el proceso de curación de la herida y evitando la infección bacteriana.

Otro objetivo de este trabajo es el estudio de la cinética de liberación del fármaco en un medio que emule en la medida de lo posible las condiciones internas del cuerpo humano.

En la figura 1 se representa el concepto de material desarrollado para cumplir estos objetivos. En la parte superior de la figura se sitúa la membrana polimérica sintetizada mediante la técnica del *electrospinning* y en la parte inferior el hidrogel, formado por cadenas entrecruzadas de ácido hialurónico modificado con tiramina.

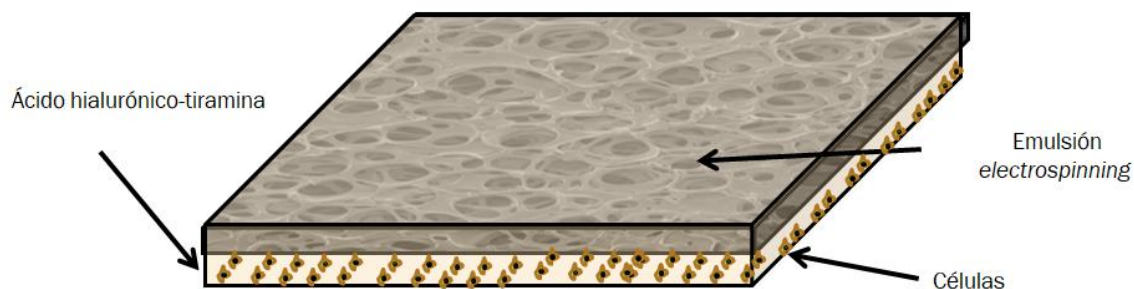


Figura 1. Representación esquemática del constructo que se desea sintetizar y caracterizar en este Trabajo Final de Grado.

Los objetivos específicos de este trabajo se enumeran a continuación:

Comprobar la efectividad de la fabricación de una membrana de *electrospinning* a partir de una emulsión de dos fases, una fase acuosa que contiene el fármaco disuelto en un polímero natural, el ácido hialurónico (HA), y otra fase polimérica formada por una disolución orgánica del polímero hidrófobo, el ácido poliláctico (PLLA).

Estudiar y visualizar mediante técnicas microscópicas el diámetro de las fibras que forman las membranas sintetizadas para comprobar su homogeneidad y la correcta elección de los parámetros en el proceso de fabricación mediante *electrospinning*.

Estudiar el grado de injerto de la tiramina en el ácido hialurónico y el tiempo de gelificación en la formación del hidrogel.

Mejorar y estudiar las propiedades mecánicas del hidrogel añadiendo en el entrecruzamiento del hidrogel la membrana de *electrospinning*, y estudiar cómo influye la concentración de hidrogel en estas propiedades mecánicas.

Determinar la cinética de liberación del antibiótico desde la membrana de *electrospinning* y analizar la influencia de la concentración de hidrogel en el constructo hidrogel-membrana en la cinética de liberación. Esta liberación se comparará con un control formado por un film que contiene la emulsión del medicamento pero no es fibroso.

4. ANTECEDENTES

Las lesiones en la piel producidas por quemaduras son problemas frecuentes y de gran riesgo ya que exponen al cuerpo humano a un riesgo sistemático de infección y en ocasiones pueden suponer una amenaza para la vida de la víctima. El tratamiento y la búsqueda de soluciones a estas lesiones han ido evolucionando a lo largo de los años y cada vez se buscan tanto técnicas más innovadoras y de mejor calidad como alternativas a los métodos más tradicionales. Tanto es así que se busca cada vez con mayor frecuencia el empleo de biomateriales específicos, que posean la capacidad de regenerar el tejido en cuestión en vez de sustituirlo o reemplazarlo como en el caso de los autoinjertos de piel.

La piel es un órgano extremadamente grande y extenso y destaca por estar formada por diferentes capas compuestas cada una de ellas por diferentes tipos de células. Es por lo tanto de vital importancia conocer íntegramente las características de la piel, su sensibilidad y reacción frente a quemaduras y por último, su proceso de cicatrización tras sufrir heridas para poder contribuir positivamente en su regeneración.

Por ello, en la primera parte de este apartado se describirá la histología de la piel resaltando sus características, se explicará con detalle como se ve afectada por los diferentes tipos de quemaduras y se definirá el proceso de curación de heridas de la piel.

Por otro lado, en torno a la ingeniería tisular, se debe conocer cómo afectará la introducción del biomaterial en el organismo y de qué modo se liberará el fármaco contenido en hidrogel hacia la zona afectada. Por ello, en la segunda parte de esta introducción se estudiará por un lado, el papel de los polímeros naturales y sintéticos como biomateriales así como los hidrogeles inyectables de ácido hialurónico, y por el otro lado, el funcionamiento del proceso de liberación de fármacos.

4.1 BIOMATERIALES E INGENIERÍA TISULAR

Hoy en día, la necesidad de regeneración de los tejidos dañados en el organismo humano es un tema de actualidad y de vital importancia. La disfuncionalidad y las posibles enfermedades que pueden sufrir los órganos son importantes problemas de salud que afectan a millones de pacientes. La mayoría de estos pacientes recurren a la búsqueda de donantes de órganos o a implantes protésicos artificiales, sin embargo, con el fin de evitar la escasez de donantes o la baja biocompatibilidad de algunos materiales sintéticos, existe actualmente una alternativa innovadora conocida como la ingeniería tisular, cuyo objetivo es la regeneración de las zonas dañadas del cuerpo humano y se basa en la aplicación de materiales ingenieriles denominados biomateriales [1].

Los científicos Robert Langer y Joseph P. Vacanti definen la ingeniería tisular como el: “Campo interdisciplinar que utiliza los principios de ingeniería y ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos funcionales que restauren, mantengan o mejoren la función de un órgano” [2]. En este contexto, la ingeniería tisular trata de combinar la ingeniería, las ciencias físicas y la medicina para ofrecer nuevas opciones innovadoras y toma por objetivo la regeneración del tejido humano y de sus zonas dañadas. Los biomateriales de ingeniería tisular juegan un rol fundamental ya que son materiales sintéticos o naturales que son implantados con la función de sustituir la matriz extracelular del tejido vivo en las primeras etapas de la regeneración, favoreciendo el normal funcionamiento de la lesión y estimulando a las células en el proceso de regeneración [3].

La ingeniería tisular se basa en la conocida “triada de la ingeniería tisular” cuyos componentes son:

- Las células, esenciales para la secreción de nuevo tejido de regeneración.
- Los biomateriales, llamados *scaffolds* (en castellano: andamiajes), que sirven de soporte para las células en las primeras etapas de regeneración y promueven la proliferación y/o diferenciación celular. Los biomateriales son biodegradables y porosos para alojar a las células y el tejido de regeneración, y a su vez permitir la difusión de nutrientes.
- Los factores de crecimiento que contribuyen a la multiplicación y diferenciación de las células.

En la siguiente figura 2 se representa un esquema que presenta los pilares fundamentales de la triada de la ingeniería tisular.

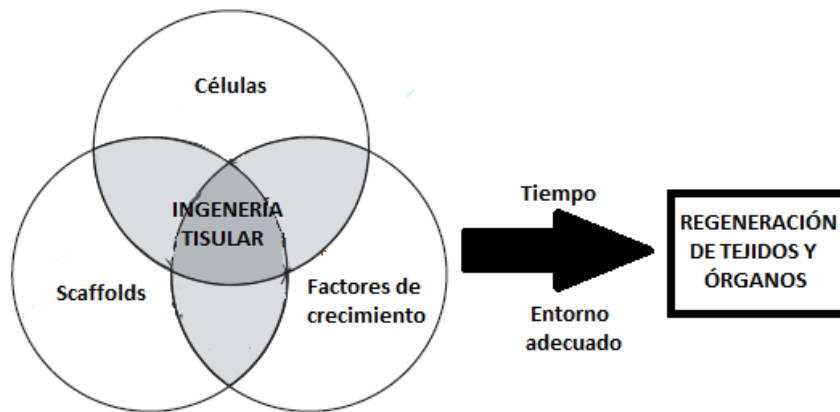


Figura 2. Esquema de la triada de la ingeniería tisular consistente en tres elementos: células, scaffolds y factores de crecimiento. Adaptada de [4].

4.2 FUNCIONES DE LA PIEL

La piel es el órgano más largo de los seres humanos y es considerado un órgano extremadamente complejo. Está formada por un tejido organizado y estructurado en diferentes capas. Una de las principales características de la piel es su función protectora, es la primera barrera de protección en todo ser humano ya que ejerce tanto de barrera física como bioquímica. Por ello, cabe destacar su capacidad de protección frente a agresiones externas tanto de microorganismos y de otros antígenos, como de la radiación ultravioleta procedente de los rayos solares.

Por otro lado, es un órgano de vital importancia ya que integra el sistema nervioso sensorial por medio del tacto y forma parte del sistema inmunitario al desencadenar el mecanismo de defensa inmunológica. Además de ello, otras propiedades significativas que presentan las distintas capas de la piel es el control de la pérdida de fluidos y el importante rol que toma cada capa en la capacidad termorreguladora de la piel para la dispersión del calor y para garantizar así la estabilidad térmica del cuerpo humano. Por otra parte, hay que destacar su función metabólica ya que en la capa intermedia de la piel se lleva a cabo la síntesis de la vitamina D [5].

En la siguiente tabla 1 se resumen las principales características y funciones de la piel como órgano en el cuerpo humano.

Tabla 1. Descripción de las funciones de la piel en el cuerpo humano [5].

Función de la piel	Descripción de la función
Inmunológica	Es la primera capa del sistema inmunitario y en ella se encuentran las principales células implicadas en dicho sistema.
Protectora	Ejerce de capa protectora de agresiones externas y de la radiación UV.
Termorreguladora	Se encarga de mantener la temperatura corporal de 37 °C mediante la sudoración y la vasodilatación que permite la pérdida de calor cuando la temperatura aumenta y la vasoconstricción dérmica que disminuye las pérdidas de calor bajo disminución de la temperatura.
Metabólica	En la piel se lleva a cabo el proceso de síntesis de la vitamina D.
Sensorial	En la piel es donde se encuentra el sentido del tacto. Es perceptora de estímulos mecánicos térmicos y dolorosos.
Reguladora de fluidos	Evita que perdamos agua por evaporación evitando de este modo la deshidratación.

4.3 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL

Para cumplir con todas estas funciones, la piel tiene múltiples componentes celulares y estructuras no celulares. Está compuesta por tres capas donde cada una de ellas se caracteriza por una organización macromolecular específica del tejido conectivo, estas diferentes áreas de la piel varían anatómicamente a causa de sus diferentes estructuras y de su composición celular [6].

Estas capas de la piel y su morfología se observan e identifican microscópicamente y son las siguientes:

- **La epidermis:** La epidermis que es la capa más externa y de origen epitelial ectodérmico. Tiene un grosor aproximado de 0,05 mm a 1,5 mm
- **La dermis:** La dermis es una capa de tejido conectivo de origen mesodérmico. Se encuentra entre la epidermis y la hipodermis. Su grosor aproximado oscila alrededor de 0,5 mm a 3,5 mm.
- **La hipodermis:** También llamada tejido subcutáneo. Es la capa más interna compuesta de tejido conectivo con grasa [7].

La unión irregular de la dermis y la epidermis se llama unión dermoepidérmica (Figura 3). Está formada por proyecciones de la dermis llamada papilas, que se entrelazan con invaginaciones de la epidermis llamadas crestas epidérmicas. Esta unión se sitúa en la membrana basal y permite o restringe el paso de células o líquidos de una capa a la otra.

Además, en la piel se encuentran los anexos de la piel que atraviesan la epidermis y se sitúan en la dermis. Estos anexos son estructuras derivadas del tejido epitelial y tienen un papel fundamental en la regeneración de la epidermis (reepitelización). Estos apéndices epidérmicos incluyen pelos, uñas y glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas [8]

En la siguiente figura 3 se puede observar detalladamente la anatomía de la piel. Se muestran las diferentes capas de la piel nombradas anteriormente así como las estructuras más importantes que componen la piel y los anexos de la piel descritos.

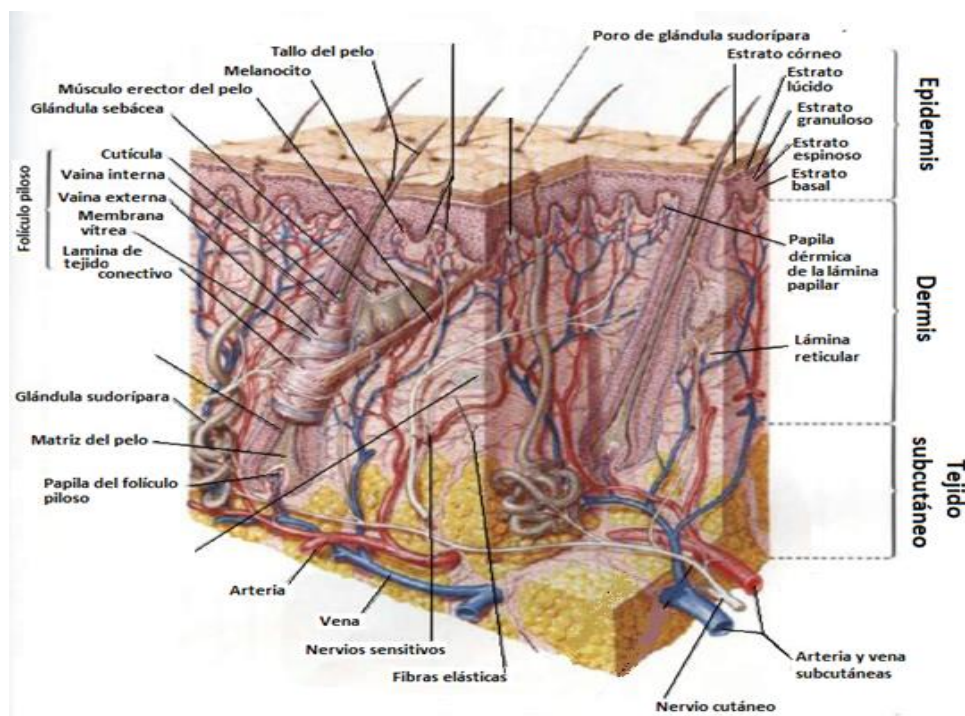


Figura 3. Anatomía de la piel [9]

En los siguientes subapartados se describen con más detalle las tres capas de la piel así como las células más importantes que se encuentran y proliferan en ellas.

4.3.1 La epidermis

La epidermis es una capa resistente e impermeable a las sustancias tóxicas y a los organismos nocivos, además es esencial para controlar la pérdida de agua del cuerpo humano. Es la capa más externa de la piel y está formada por dos tipos de células: queratinocitos (95 % de las células de la epidermis) que forman un epitelio escamoso estratificado y células dendríticas [10].

a) Queratinocitos

Más detalladamente la epidermis se constituye por cuatro capas denominadas estratos y diferenciadas por las diferentes etapas de maduración de los queratinocitos [10]. Solamente en las zonas más gruesas de piel (palmas de las manos y pies) se puede diferenciar una capa más formada por células densamente comprimidas. Las cuatro capas de la epidermis se identifican en la figura 3 y son las siguientes:

1. Estrato basal (capa basal):

Es la capa más interna de la epidermis y en ella se producen los queratinocitos. Consiste en una sola capa de células cilíndricas, siendo células activas que dan lugar a otros queratinocitos. Se supone que una vez que una célula se ha formado en la capa basal, el tiempo necesario para su desplazamiento a la superficie de la capa granular es entre 26 y 42 días [11]. Se requieren 14 días adicionales para el paso de las células a través de la capa cornificada, la capa más externa de la epidermis [12]. Las células basales se disponen como una sola fila de células cuboides (Figura 4). Una membrana basal separa la capa basal de la dermis. También en esta capa se encuentran esparcidos por las células basales los melanocitos dendríticos, células responsables de la fabricación de la melanina [13].

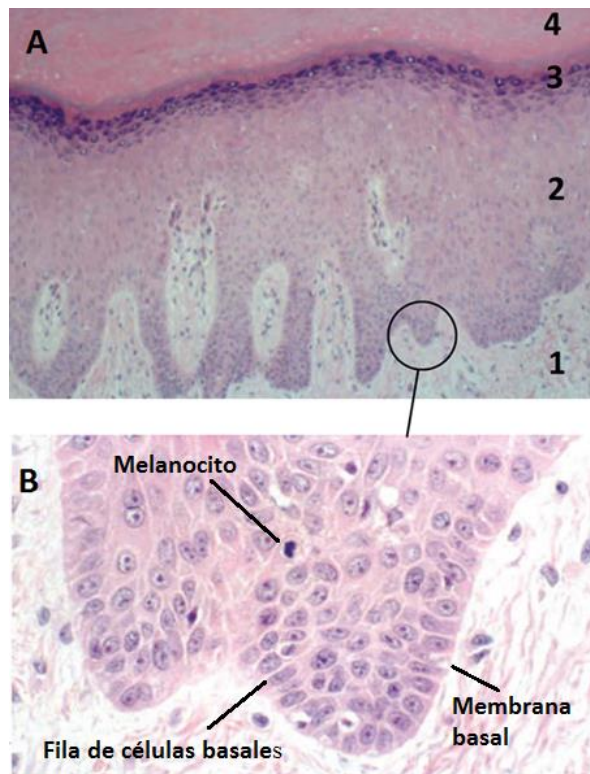


Figura 4. A) Capas de la epidermis: 1 Capa basal; 2 Capa espinosa; 3 Capa espinosa; 4 capa córnea
B) Detalle concreto de la capa basal y su unión con capa espinosa separadas por la membrana basal
[14]

2. Estrato espinoso (capa espinosa):

Se sitúa sobre la capa basal y se compone de 2 a 6 capas de células poligonales. Estas células se van aplanando según se acercan a la superficie. El aspecto espinoso de estas células se debe a que parecen estar unidas por puentes intercelulares que dan a cada célula un aspecto espinoso. Estos puentes son áreas de contacto entre las células llamados desmosomas. Los desmosomas intercelulares son particularmente evidentes entre las células de la capa escamosa como proyecciones cortas que se extienden de una célula a otra, estas áreas se puede observar en la figura 5. Además en esta capa los queratinocitos producen queratina.

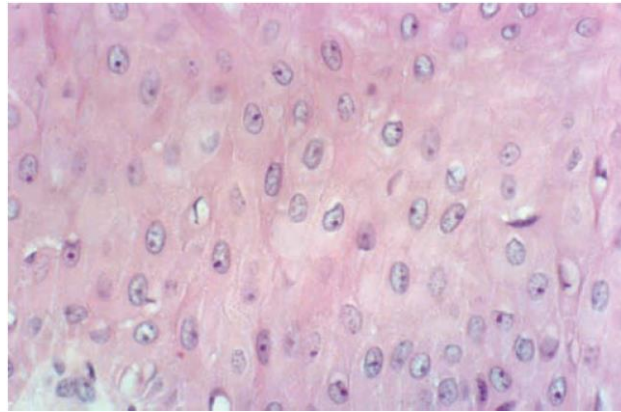


Figura 5. Capa de células escamosas con presencia de puentes intercelulares (desmosomas) entre las células. [14]

3. Estrato espinoso (capa espinosa):

Posee de una a tres células de espesor y muestra células aplanadas que contienen gránulos de queratohialina (Figura 6). Estos gránulos son precursores de fillagrin, que promueve la agregación de filamentos de queratina en la capa cornificada. Esta capa se desarrolla mejor en la piel gruesa de las palmas de las manos y plantas de los pies, donde se produce abundante queratina.

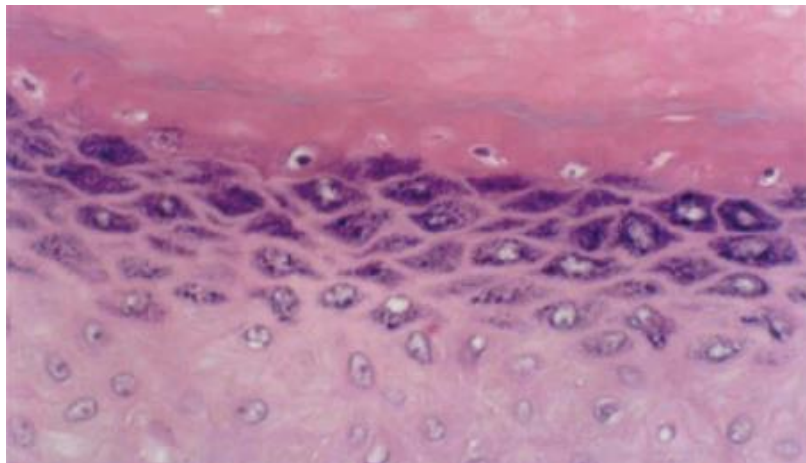


Figura 6. Capa de células granulares con gránulos de queratohialina (puntos oscuros en células planas) [14]

4. Estrato córneo (capa córnea):

En la piel gruesa, por encima y adyacente al estrato granuloso, hay una única capa de células hialinas anucleares. Contiene células que carecen de núcleos y orgánulos pero depositados en filamentos de queratina incrustados en una matriz amorfa densa [15]. Estas células se reúnen para formar una membrana resistente y plegable, relativamente impermeable. La capa córnea es donde se observan los poros de las glándulas sudoríparas y las glándulas sebáceas.

b) Células dendríticas

1. *Melanocitos*

Los melanocitos son células dendríticas derivadas de las neuronas cresta neural. En la epidermis los melanocitos se localizan en la capa basal, y sus proyecciones dendríticas se extienden en todas direcciones. Los melanocitos son células productoras de melanina, un pigmento de color marrón que es el principal responsable del color de la piel. Una vez formada, la melanina se acumula en gránulos (melanosomas) en el interior de los melanocitos. Estos melanosomas migran a través de las proyecciones melanocíticas dendríticas y se transfieren a los queratinocitos adyacentes. El número de melanocitos en la piel normal es constante en todas las razas. La relación es 1 melanocito por cada 4-10 células basales [16].

2. *Células de Langerhan*

Las células de Langerhans son células dendríticas derivadas de una célula precursora en la médula ósea y se sitúan en las capas más altas del estrato espinoso. El número de células de Langerhans es similar al de los melanocitos, pero se encuentran principalmente en el estrato espinoso (capa de células escamosas). Las células de Langerhans son las células inmunológicas de la piel y funcionan como células que presentan el antígeno a los linfocitos del organismo [17].

3. *Células de Merkel*

Las células de Merkel están presentes en la superficie inferior de la epidermis, vaina externa del folículo piloso y mucosa oral.

4.3.2 La dermis

La dermis es un tejido fibroelástico que sostiene y nutre la epidermis y sus anejos. Se divide en dos zonas: dermis papilar y dermis reticular.

- **Dermis papilar o superficial.** Se encuentra debajo de la epidermis y alrededor de las estructuras anexiales. Los cuerpos papilares se proyectan hacia arriba formando una serie de valles y proyecciones que encajan con la superficie ondulada de la epidermis. Se compone de una fina red de colágeno tipo I y III, fibras elásticas y abundante sustancia fundamental.
- **Dermis reticular o profunda.** Se compone de haces gruesos de colágeno tipo I y tejido elástico. La dermis también alberga plexos vasculares, redes neuronales, sustancia fundamental y sus células dérmicas productoras.

La dermis está formada por un complejo conjunto de fibras entrelazadas. Las principales células que se pueden encontrar en la dermis y por lo tanto su mayor componente son los fibroblastos dérmicos que producen fibras del tejido conectivo y la sustancia termal dérmica. Estos fibroblastos son los

encargados de sintetizar las fibras de colágeno y las fibras elásticas que forman la dermis. Además de los fibroblastos, otras células que se ven en la dermis normal son histiocitos y mastocitos. También se encuentran en la dermis células que pertenecen al sistema inmunológico y que varían su presencia en función de las circunstancias de la piel, se pueden detectar linfocitos dispersos o neutrófilos en la dermis en secciones normales de la piel [18].

La dermis está por lo tanto formada por un complejo conjunto de fibras entrelazadas. El tejido conjuntivo dérmico consiste en fibras colágenas y elásticas. El colágeno constituye el 70% del peso de la dermis seca. En la dermis papilar y adventicia se encuentra una malla finamente tejida de fibras de colágeno. En la dermis reticular, las fibras de colágeno se unen en paquetes gruesos. Las fibras de colágeno no son extensibles, pero su disposición ondulada en la dermis permite que la piel se estire.

Cabe destacar que el colágeno y las fibras elásticas en la dermis están incrustadas en una sustancia fundamental que consiste principalmente en mucopolisacáridos ácidos no sulfatados (glicosaminoglicanos), en gran parte ácido hialurónico.

4.3.3 La hipodermis

La hipodermis es la capa más profunda de la piel y por ello separa a la piel del músculo o del hueso subyacente. El tejido subcutáneo está dispuesto en lóbulos de adipocitos maduros, estas son las células que forman la hipodermis. Estas células se disponen en lóbulos que están separados por bandas finas de septos de tejido conectivo más concretamente por haces de fibras colágenas y elásticas conocidas como trabéculas. Las arterias y las venas viajan en los septos antes de llegar a la profundidad del plexo vascular. A parte de esto, las estructuras que también se pueden encontrar en el tejido subcutáneo son: vasos sanguíneos, nervios, fibras nerviosas que perciben la vibración (corpúsculos de Pacini), o incluso células musculares planas.

4.4 GRAVEDAD DE LAS QUEMADURAS EN LA PIEL

Una quemadura es la descomposición de tejido orgánico provocada generalmente por el efecto del calor, debido a corriente eléctrica, por el efecto de radiación o debido a reacción con sustancias químicas. Las quemaduras en la piel son las lesiones más frecuentes producidas en este órgano y los casos más graves se producen generalmente por incendios en accidentes de tráfico, accidentes laborales y accidentes domésticos [19].

La pérdida de piel a causa de quemaduras es una lesión grave y peligrosa, estas lesiones disminuyen la función protectora de la piel sometiendo al organismo a riesgo de infecciones bacterianas o de cualquier agente externo que pueda perjudicar a la salud del damnificado [20].

La gravedad de una quemadura en la piel depende fundamentalmente de la capa de la piel afectada por dicha quemadura, diferenciando entre quemaduras de primer grado, heridas superficiales que afectan solo a la epidermis, quemaduras de segundo grado, que afectan tanto a la capa externa como a la dermis, y las quemaduras de tercer grado, que afectan a la totalidad de las capas de la piel causando graves repercusiones. Las quemaduras de tercer grado requieren un tratamiento más

exhaustivo ya que pueden derivar en alteraciones fisiológicas, exponiendo al cuerpo humano a un riesgo de infección y poniendo en riesgo la salud del paciente [13] [21].

En resumen, los efectos nocivos de las quemaduras de la piel se determinan en gran medida por la profundidad de la lesión y el área superficial involucrada. Las quemaduras se pueden clasificar y nombrar también como superficiales, de espesor parcial o de espesor total. Cada tipo de estas heridas se describe a continuación:

- **Las quemaduras superficiales o quemaduras de primera grado:** *(Figura 7a)*

Involucran la epidermis y es el ejemplo típico de las quemaduras solares. La piel está enrojecida y caliente, hay dolor y junto con él edema, pero no hay ampollas. Parte de la epidermis se puede pelar, sin embargo la curación se completa en menos de una semana.

- **Quemaduras de espesor parcial o quemaduras de segundo grado superficial o profundo:** *(Figura 7b y 7c)*

El espesor parcial implica que hay suficientes restos epiteliales que quedan profundamente para una regeneración espontánea. El daño se extiende a través de la epidermis y envuelve la dermis. Sin embargo, la piel puede regenerarse a partir del revestimiento epitelial de estructuras anexas, tales como folículos pilosos, y glándulas sudoríparas y sebáceas. Por lo tanto, las quemaduras de grosor parcial se caracterizan por formación de ampollas y pérdida de la capa epitelial. La quemadura es dolorosa y muy sensible. Se reconoce por ser de un color rosa salmón a rojo y blanquearse al tacto; o, si es más profundo, puede estar cubierto con una escara blanca superficial suave de color blanco amarillento. El tiempo necesario para la reepitelización, que es la regeneración de la epidermis, es proporcional a la profundidad de la quemadura. Puede variar de 7 a 21 días. Las más profundas, en presencia de infección o isquemia, pueden considerarse en ocasiones como quemaduras de grosor completo debido al daño que ocasionan en el tejido.

- **Quemaduras de espesor total o quemaduras de tercer grado:** *(Figura 7d)*

Las quemaduras de espesor total se extienden a través de la dermis y la grasa. Estas quemaduras suponen grandes amenazas al exponer al organismo a un riesgo de invasión de bacterias y de pérdida de fluidos [20]. No dejan restos epiteliales profundos y pueden curarse espontáneamente sólo por contracción y por migración de las células epiteliales del tejido sano en su periferia. Tiene una calidad dura, seca y coriácea. El color es generalmente gris nacarado y amarillento o un negro carbonizado. La piel está completamente desnaturalizada y contraída. En quemaduras circunferenciales extensas, esta contractura puede conducir a compromiso respiratorio cuando el tórax está involucrado e isquemia periférica cuando la quemadura involucra los miembros. Algunas secuelas del trauma de quemadura en la epidermis resultan de la destrucción de su función de impermeabilización y barrera. No sólo el cuerpo se vuelve susceptible a la invasión de bacterias, sino que también pierde fluido, perdiendo su capacidad para mantener el equilibrio hídrico normal. Además, los tejidos quemados no pueden realizar su función vasoreguladora normal, y el individuo es incapaz de mantener la temperatura corporal.

En la figura 7 se observan los diferentes grados de afección de una herida distinguiendo en cada imagen la capa de piel a la que afecta. La descripción de cada foto se redacta a continuación:

- a. Una quemadura superficial sólo afecta a la epidermis. Se prevé una completa recuperación.
- b. Una quemadura superficial de grosor parcial penetra corta distancia en la dermis. Las ampollas son características, y hay un mucho de tejido epitelial remanente para permitir la curación espontánea en 1-2 semanas. La quemadura raramente cicatriza pero puede producir cambios pigmentarios.
- c. Quemadura profunda de espesor parcial. Las ampollas se queman dejando una superficie blanca rosácea y húmeda. A menudo hay una delgada escara. La curación es a menudo prolongada 2-6 semanas y son comunes las cicatrices hipertróficas.
- d. Una quemadura que penetra en todo el grosor de la epidermis, la dermis y en la grasa destruye todos los restos epiteliales. La curación sólo puede tener lugar desde la periferia de la herida. Este es un proceso lento y conlleva con facilidad una cicatriz contráctil

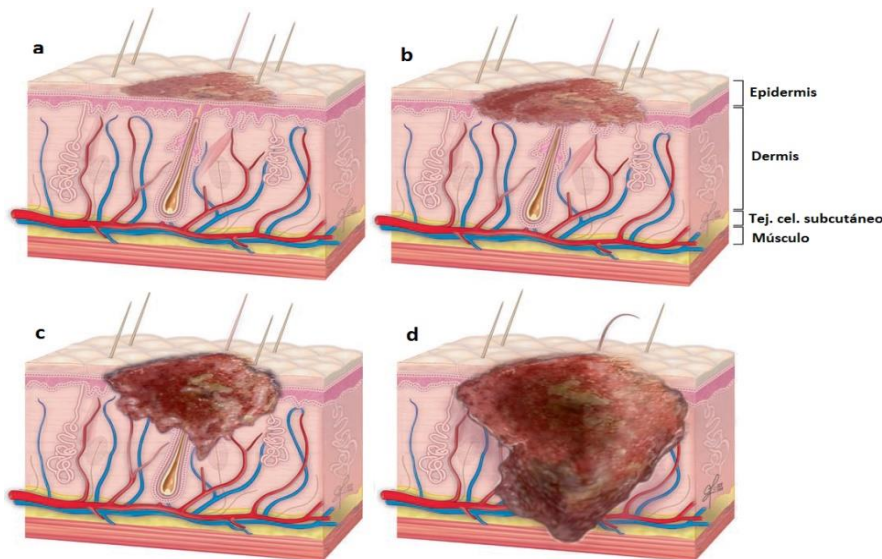


Figura 7. Distintos grados de afección de una quemadura en la piel según la capa a la que afecta [22]

4.5 SUSTITUTOS DE LA PIEL.

La pérdida total o parcial de la piel viene determinada por la gravedad de la quemadura sufrida. Las quemaduras representan un problema clínico de elevada importancia y de alta complejidad que a día de hoy está lejos de ser resuelto y preocupan cada vez más a la sociedad. Actualmente el objetivo que se buscan con las diferentes alternativas en términos de sustitutos de la piel es el de originar un material que sea capaz de mimetizar con el mayor éxito posible las propiedades de la piel (enumeradas en el apartado 2.1) y que reemplace de este modo y en la medida de lo posible a la piel. La búsqueda del tratamiento más adecuado para la solución de este problema clínico deriva en muchos campos de investigación y de estudio, siendo los tratamientos estándar y más comunes los injertos y autoinjertos de piel ya que han conseguido desde hace años sustituir de forma eficaz la zona afectada de la piel [23].

Los autoinjertos de piel consisten en implantar directamente un fragmento de piel sana del propio paciente (generalmente de los glúteos o parte interior del muslo). A pesar de ser una técnica muy empleada solamente es viable en quemaduras de hasta un 40% del total de la superficie corporal y además algunas de las heridas no cicatrizan por completo [5].

Por su parte, los injertos provenientes de donantes son aplicables a quemaduras más profundas y que perjudican notoriamente a las capas profundas de la piel. No obstante, esta técnica pierde rendimiento y en ocasiones es inviable cuando se aplica en pacientes con quemaduras de elevado grado o muy extensas debido a la escasez de donantes y al elevado tiempo de curación que estas heridas conllevan. A parte de ello, al implantarse tejido de un donante, existen problemas de rechazo que en ocasiones dificultan la operación y la calidad de vida del paciente [20].

El avance de la medicina ha supuesto la implicación de los polímeros biodegradables como biomateriales para usos médicos y actualmente son protagonistas como sustitutos de la piel o como soporte para su regeneración.

4.6 PAPEL DE LOS MATERIALES BIODEGRADABLES EN LA CURACIÓN DE QUEMADURAS.

En los últimos años, los profesionales de la salud se enfrentan con un número creciente de pacientes que sufren de heridas y quemaduras difíciles de tratar y curar. Los tratamientos para regenerar la piel de las quemaduras se consideran tediosos y duraderos, por este motivo, el uso de sustancias biodegradables para acelerar el proceso de cicatrización se emplea como posible solución. [24] [25].

Debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y similitud con las macromoléculas del cuerpo humano, algunos polímeros naturales como los polisacáridos, se utilizan ampliamente en el tratamiento de heridas y quemaduras. La característica principal de los polímeros naturales empleados para ingeniería tisular de la piel es que tienen propiedades emolientes, demulcenantes, epiteliales, astringentes, antimicrobianos, antiinflamatorios y antioxidantes que pueden mejorar el proceso de cicatrización de heridas [26].

Por otro lado, algunos polímeros sintéticos como el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico, o la policaprolactona, consiguen mejorar la reepitelización proporcionando un microambiente óptimo

para la proliferación, migración y diferenciación celular, debido a su biocompatibilidad, a su biodegradabilidad y a sus buenas propiedades mecánicas. Además, muchos de ellos tienen actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y antitumoral. [27].

Mediante factores de crecimiento y polímeros naturales o sintéticos, el concepto moderno de apósito interactivo prevé los cambios en el entorno de la herida para una mejor cicatrización y para estimular el proceso de epitelización [28] [29]. Por ello, las terapias de curación de heridas más actuales consisten en la administración local de factores de crecimiento y la aplicación de piel creada por ingeniería.

Para la ingeniería de tejidos se emplean matrices de nanofibras, microesferas o hidrogeles obtenidos de polímeros biodegradables y biocompatibles. Contienen moduladores celulares y moleculares que estimulan la cicatrización de las heridas. Debido a su estructura porosa y su buena resistencia mecánica, proporcionan un microambiente óptimo para la proliferación, migración y diferenciación celular. Además, para la regeneración completa de tejidos dañados, la base de sustentación, basadas en poliméricos naturales o sintéticos, pueden proporcionar una matriz extracelular biocompatible [30].

Para la regeneración de heridas de espesor total, los polímeros naturales más comunes utilizados en el campo de la ingeniería de tejidos son los polisacáridos y proteínas. Se caracterizan por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y similitud con la matriz extracelular. Los principales polímeros empleados como apoyo en las quemaduras, actúan como sustratos biocompatibles similares a las macromoléculas reconocidas por el cuerpo humano [31].

En los últimos años, a partir de polímeros naturales (colágeno, fibrinógeno, elastina, ácido hialurónico) o sintéticos (ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polidioxanona) se ha producido matriz extracelular biomimética. Se han usado tanto para la cicatrización de heridas o reparación de tejidos (cartílagos, huesos, vasos, nervios y ligamentos) como para la regeneración de los mismos [32]. A parte de ello, las membranas de nanofibras pueden usarse como portadores de principios activos locales (fármacos antimicrobianos y antiinflamatorios) que aceleran el proceso de cicatrización de heridas [33].

Las macromoléculas naturales suelen suministrarse en forma de hidrogeles y muestran una resistencia mecánica relativamente baja en comparación con los polímeros sintéticos. Para mejorar sus propiedades mecánicas se mezclan con polímeros sintéticos.

Por estas razones, estos hidrogeles han sido propuestos para la curación de heridas, la ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y el trasplante de órganos. [34]

4.7 HIDROGELES INYECTABLES

Un hidrogel es un material polimérico entrecruzado en forma de red tridimensional compuesta de cadenas flexibles de polímeros capaces de absorber grandes cantidades de agua sin disolverse en ella. Esto es posible gracias al entrecruzamiento de las cadenas del hidrogel, a mayor grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas menor capacidad de hinchamiento poseerá el hidrogel [20].

Un hidrogel ideal para aplicación en la piel debería cumplir siguientes características [23]:

- Imitar perfectamente las características del tejido.
- Ser duradero.
- Ser una barrera de bacterias y de sustancias externas.
- Facilidad de aplicación.
- No ser dañino para el paciente.
- No ser citotóxico.
- Ser biocompatible y biodegradable.

Los hidrogeles inyectables o *in situ* son aquellos que pueden reticular mediante reacciones no citotóxicas y pueden ser inyectados en el defecto a regenerar de forma líquida, formando el hidrogel en el cuerpo, siendo capaces de encapsular células en este proceso. Los hidrogeles inyectables permiten mejorar la técnica de aplicación del biomaterial en la zona afectada y consiguen, al reticular tras ser aplicados, adaptarse perfectamente a la superficie de la piel donde se produce la herida y cubrir así cualquier irregularidad que presente la superficie cutánea a tratar.

4.7.1 Hidrogeles de ácido hialurónico modificado con tiramina

El ácido hialurónico es un polisacárido lineal de alto peso molecular que está formado por la alternancia de disacáridos a lo largo de su cadena. Las unidades que conforman el disacárido son el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina. Además del colágeno, el principal componente de la matriz extracelular de la piel es el ácido hialurónico (HA). Este polímero es un polímero natural que desempeña un rol fundamental en un elevado número de procesos biológicos, entre ellos el proceso de curación de una herida. Presentan unas excelentes características de biocompatibilidad y biodegradabilidad y viscoelasticidad que le dan un gran número de aplicaciones en medicina regenerativa [35]. La estructura de un disacárido del ácido hialurónico se observa en la figura 8.

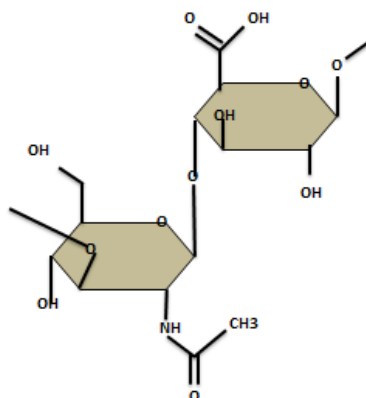


Figura 8. Estructura química de una unidad de repetición del ácido hialurónico formada por el par de unidades del ácido glucurónico y por la N-acetilglucosamina.

Por su parte la tiramina es una monoamina metabolizada por la enzima denominada monoamina oxidasa. La tiramina contiene en su estructura grupos amina y fenol lo que hace posible su injerto en el ácido hialurónico y su posterior entrecruzamiento a partir de los grupos fenol que quedan libres. En la figura 9 se puede observar la estructura química de la tiramina y la localización de sus grupos fenol y amina.

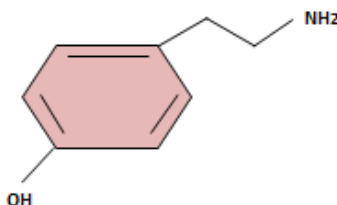


Figura 9. Estructura química de la tiramina.

El injerto de tiramina en el ácido hialurónico permite tener grupos fenol en las cadenas del ácido hialurónico. Esto es de vital importancia para el posterior entrecruzamiento del hidrogel mediante la enzima Horseradish Peroxidase (HRP) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para esta reacción de injerto se busca que los grupos amina de la tiramina reaccionen y formen enlaces con los grupos carboxilo del ácido hialurónico dejando así libres los grupos fenol para el entrecruzamiento posterior.

Para llevar a cabo esta reacción se emplea como productos intermedios 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) que actúa como catalizador y N-Hidroxisuccinimida (NHS) que es un activador.

En primer lugar, se efectúa la reacción que se observa en la figura 10. El ácido hialurónico reacciona con el EDC que es una carbodiimida que actúa como catalizador de la reacción y que por tanto

acelera esta reacción y permite la formación de la O- acylisourea que actúa como intermedio de reacción.

El EDC se añade al ácido hialurónico ya que permite activar el grupo carboxilo para la formación de un éster. El intermedio formado, la O-acylisourea es muy inestable y propensa a reacciones laterales pero es esencial para que reaccione con el grupo amina de la tiramina.

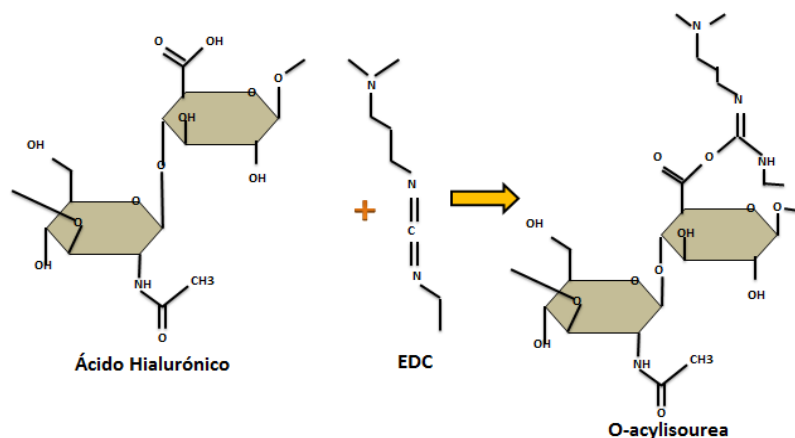


Figura 10. Reacción del ácido hialurónico con EDC para la formación de la O-acylisourea

Por su parte, la figura 11 representa la siguiente reacción que se produce para lograr el injerto de tiramina. En esta reacción se añade NHS que es una imida muy reactiva que actúa como activador y cuya función esencial es mantener disponibles durante más tiempo los sitios activos que son necesarios para la reacción. El intermedio de la reacción, la O-acylisourea, reacciona con la NHS. La formación de un NHS ester hace que este intermedio sea mucho más estable. Este aditivo de NHS se añade también para mejorar la eficiencia, para aumentar los rendimientos y disminuir las reacciones laterales.

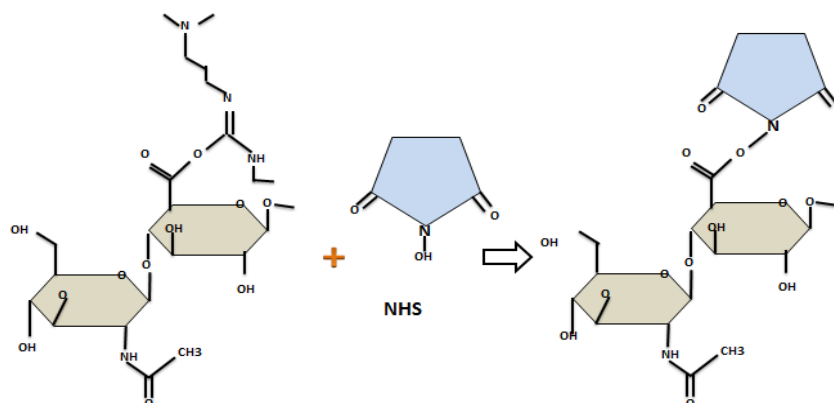


Figura 11. Reacción de la O-acylisourea con el NHS

A partir de esta reacción es cuando se añade la tiramina que reacciona con el intermedio de reacción. El grupo amina de la tiramina es un buen nucleófilo y por ello ataca al grupo carbonilo de la otra molécula que es electrófilo formando así un enlace amida y dando lugar al injerto de los grupos tiramina en las cadenas del ácido hialurónico. En la figura 12, se puede observar el monómero polimérico de la reacción final tras del injerto de tiramina en ácido hialurónico.

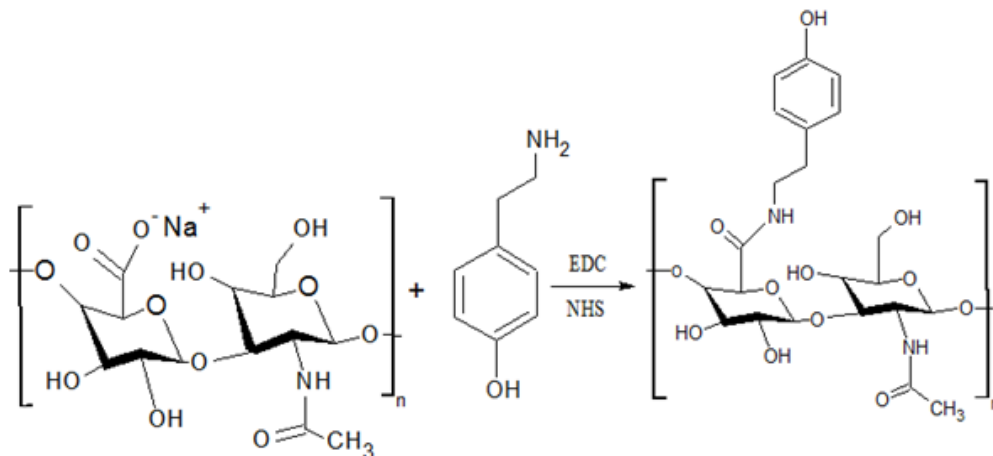


Figura 12. Obtención del producto final formado por cadenas de ácido hialurónico modificado con tiramina. Obsérvense los grupos fenol de la tiramina en las cadenas lateral para el entrecruzamiento del hidrogel.

Para la formación del hidrogel *in situ* mediante entrecruzamiento enzimático, se emplean agentes entrecruzadores. Ejemplos de estos agentes y los más empleados para entrecruzar hidrogeles inyectables son la transglutaminasa, la tirosinasa y la peroxisada, ambas son enzimas capaces de entrecruzar el hidrogel. Para el caso de los hidrogeles de ácido hialurónico y tiramina la peroxidasa (HRP: Horseradish Peroxidase) es considerada la enzima que garantiza una velocidad de reticulación mayor y además permite la reticulación del hidrogel inyectado con la propia matriz extracelular natural, lo que es garantía de una mejora en la integración del hidrogel.

Por lo tanto, la peroxidasa (HRP) se emplea para el entrecruzamiento del hidrogel y es imprescindible para catalizar la reacción de entrecruzamiento. Esta enzima requiere de la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como sustrato del poder oxidante de este peróxido. La base de la reacción de entrecruzamiento se puede observar en la figura 13, se observa la formación de retículos mediante el empleo de peroxidasa y peróxido de hidrógeno en las moléculas de ácido hialurónico modificado con tiramina.

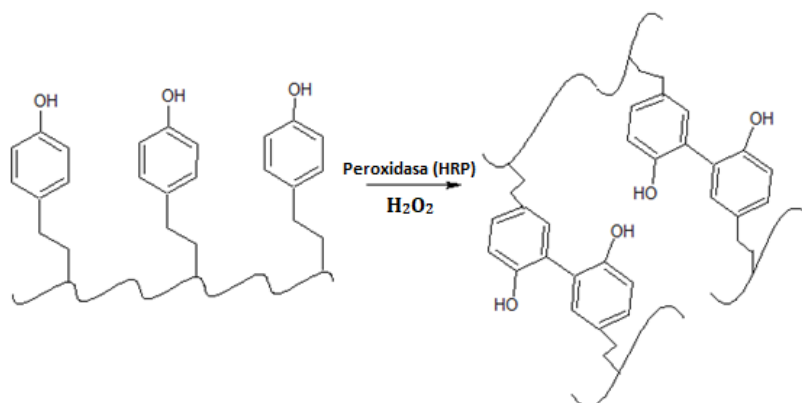


Figura 13. Entrecruzamiento del hidrogel de ácido hialurónico modificado con tiramina empleando peroxidasa (HRP) como entrecruzador y peróxido de hidrógeno.

4.7.2 Sistema de liberación de fármacos a partir de un hidrogel

El uso de hidrogeles como aplicación para de sistema de liberación controlada de fármacos es un método cada más desarrollado, esto se debe en parte a la duración que aportan como efecto farmacológico. Las otras alternativas como la inyección directa de la droga en la sangre no es una técnica muy conveniente para los pacientes. Por su parte, el suministro del medicamento por vía oral es una técnica que destaca por ser una forma simple de suministro pero sufre de algunas limitaciones como la posible hidrólisis del medicamento en la vía gástrica o la falta de solubilidad de algunas drogas en el organismo [36].

En cambio, el empleo de hidrogeles en liberación de fármacos está en continuo estudio y desarrollo debido principalmente a la compatibilidad tisular que presentan y su fácil manipulación bajo condiciones de hinchado. Las propiedades físicas de estos materiales en particular su estructura porosa y el grado de entrecruzamiento del hidrogel, permiten la captación de agua del biomaterial y como consecuencia la liberación del fármaco cargado en la estructura del hidrogel. La liberación de un medicamento a partir de un hidrogel implica la absorción de agua en la matriz del polímero y la consecuente difusión de la droga. Además, otra de las ventajas del empleo de hidrogeles para la liberación de fármacos es que se consigue un alto rendimiento a la hora de evitar la infección ya que algunos son antiinflamatorios.

Los factores que afectan a la liberación de la droga o fármaco desde el hidrogel son los enumerados a continuación [37]:

- El método de carga del fármaco en el polímero.
- El balance general de hidrofiliidad/hidrofobicidad del polímero.
- El efecto osmótico del fármaco disuelto.
- La elasticidad de las cadenas poliméricas.

La siguiente figura 14 muestra una gráfica donde se observan las diferencias de concentración en sangre del medicamento frente al tiempo según el método de suministro del fármaco. Se observa que el método de liberación controlada de fármaco es el ideal ya que permite suministrar la dosis adecuada de medicamento durante el periodo más largo de tiempo.

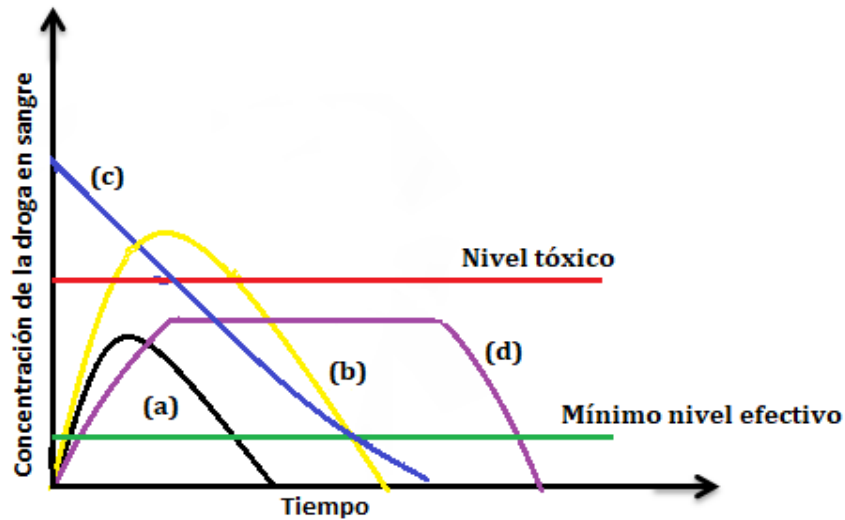


Figura 14. Representación de la concentración típica de una droga en sangre variando el método de suministro frente al tiempo. (a) Dosis estándar oral; (b) sobredosis oral; (c) inyección; (d) liberación controlada dosis ideal.

Finalmente se enumeran las ventajas más destacables que aporta la liberación controlada de fármacos para la regeneración de la piel [20]:

- Fácil manipulación de las drogas
- Rápida biodegradabilidad
- Aseguramiento de la continuidad del tratamiento en la fase nocturna
- Localización de la liberación de la droga en una región particular de la piel
- Permite la preservación de medicamentos que son rápidamente destruidos por el organismo.
- Mejora del confort del paciente
- Extienden la duración de la actividad

4.8 MEMBRANAS PARA ESTABILIDAD MÉCANICA.

En tratamientos y regeneración de la piel las membranas basadas en biomateriales han sido empleadas en numerosas aplicaciones biomédicas. Las bajas propiedades mecánicas que presenta el ácido hialurónico requieren un refuerzo en la formación del hidrogel que mejore estas propiedades. La solución de este problema se ha llevado a cabo en este trabajo mediante la fabricación de membranas poliméricas de *electrospinning* porque permiten obtener láminas finas de fibras de espesor adecuado para la regeneración de la piel. Además, mediante emulsión se puede introducir un fármaco soluble en agua y ser liberado de forma controlada en la zona afectada, regulando la liberación a través de un hidrogel ensamblado a la membrana [38]. Además, esta técnica se considera una técnica muy versátil y de extrema utilidad y una de sus principales ventajas es que no es un proceso complejo ni sofisticado, es un proceso simple y que no requiere del empleo de equipos de gran coste económico. Las membranas presentan además muy buenas propiedades mecánicas debido al elevado número de fibras que se forman [24].

La técnica del *electrospinning* permite la creación de fibras de escala manométrica. Se basa en la aplicación de una diferencia de potencial de alto voltaje entre la punta de una aguja metálica de pequeño diámetro, que ejerce como ánodo, y un colector que ejerce como cátodo y es el soporte de deposición del polímero. La aguja está conectada a una jeringuilla que contiene el polímero disuelto que va fluyendo a una determinada velocidad por el efecto de empuje de una bomba de jeringuilla, este flujo permite la formación de una gota en la punta de la aguja que es sometida al alto voltaje. La aplicación del alto voltaje permite que la fuerza electrostática supere a la fuerza de cohesión de la solución y consecuentemente se cree un jet de polímero a partir de la formación de la gota. Consecuentemente, el jet se va depositando el colector mientras el disolvente orgánico del polímero se va evapora en el trascurso del jet [36]. La figura 15 muestra una representación del proceso.

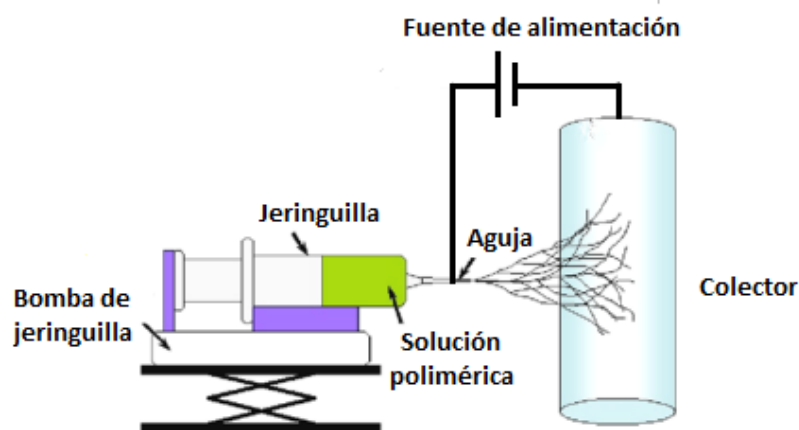


Figura 15. Esquema del proceso de *electrospinning*. Modificada de [4].

Las membranas producidas a partir de esta técnica están formadas por fibras poliméricas con un rango de diámetros que puede variar desde unos pocos nanómetros hasta los 100 nanómetros de diámetro [39]. La variedad en los diámetros de fibras se debe principalmente a los parámetros del proceso de *electrospinning* (tabla 2). La elección de unos parámetros óptimos en cada proceso supone mejorar en la medida de lo posible la morfología del biomaterial, la obtención de fibras de longitudes y grosor homogéneas evitando la formación de perlas en dichas fibras producidas por una inadecuada evaporación del solvente en el trayecto hasta el colector, lo que supone una ineficiente deposición de las fibras [40].

Tabla 2. Parámetros característicos de los que depende cualquier proceso de *electrospinning* [4].

Parámetro de <i>electrospinning</i>	Descripción
Concentración fase polimérica	La concentración de polímero es fundamental en la deposición de las fibras en el colector debido a la viscosidad que aporta este factor a la disolución polimérica
Voltaje	El voltaje aplicado determina la fuerza con la que la gota de disolución polimérica va a ser atraída hacia el colector. Si el voltaje es muy elevado no permitirán la evaporación correcta del disolvente
Distancia aguja – colector	La distancia entre la aguja y el colector determinan la distancia que recorre el jet hasta su deposición.
Flujo volumétrico	El flujo con el que la bomba empuja la disolución es un parámetro que determina la morfología de las fibras ya que este implica la frecuencia con la que la gota se va formando en la aguja y por ello influye en la formación de las fibras
Diámetro de la aguja	El diámetro de la aguja que contiene la disolución polimérica influye en el diámetro de las fibras ya que determinan el diámetro inicial del jet polimérico. Los diámetros de aguja más grandes tienden a producir menos perlas en las fibras.

5. NORMATIVA

La normativa seguida ha sido tomada del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Los reales decretos seguidos durante la realización de la parte experimental en un laboratorio químico, hacen referencia en gran parte a la clasificación y gestión de residuos peligrosos y a la seguridad y riesgos mantenidos en el laboratorio. Estos son:

- Real Decreto 1802/2008, del 3 de noviembre, por el que se modifica el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, aprobado por el Real Decreto 363/1995, del 10 de marzo, con la finalidad de adaptar sus disposiciones al Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (Reglamento REACH).
- Real Decreto 1801/2003, del 26 de diciembre, sobre seguridad general de los productos.
- Real Decreto 773/1997, del 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual.
- Real Decreto 486/1997, del 14 de abril, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo.
- Real Decreto 1215/1997, del 18 de julio, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo.
- Real Decreto 393/2007, del 23 de marzo, por el que se aprueba la norma básica de autoprotección de los centros, establecimientos y dependencias dedicados a actividades que puedan dar origen a situaciones de emergencia.
- Real Decreto 374/2001, del 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- Real Decreto 773/1997, del 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual.
- Real Decreto 1644/2008, del 10 de octubre, por el que se establecen las normas para la comercialización y puesta en servicio de las máquinas.
- Real Decreto 374/2001, del 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

- Real Decreto 2267/2004, del 3 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de seguridad contra incendios en los establecimientos industriales.
- Real Decreto 379/2001, del 6 de abril, por el que se aprueba el Reglamento de almacenamiento de productos químicos y sus instrucciones técnicas complementarias MIE APQ-1, MIE APQ-2, MIE APQ-3, MIE APQ-4, MIE APQ-5, MIE APQ-6 y MIE APQ-7.
- Real Decreto 39/1997, del 17 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención.
- Real Decreto 1070/2012, del 13 de Julio, por el que se aprueba el plan estatal de protección civil ante riesgo químico.
- Real Decreto 833/1988, del 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos.

6. METODOLOGÍA

En el apartado de metodología se describen los materiales y los reactivos empleados así como el procedimiento experimental seguido en cada uno de los ensayos empleados en la realización de este trabajo.

6.1 UTENSILIOS EMPLEADOS A NIVEL DE LABORATORIO

El material y utensilios empleados a nivel de laboratorio se enumeran a continuación:

- 4 Vasos de precipitado de 250 mL
- 4 Vasos de precipitado de 50 mL
- 1 Vaso de precipitado de 25 mL
- 2 Vasos de precipitado de 2,5 L
- Micropipeta con un rango de trabajo de 1000 a 100 μ L
- Micropipeta con un rango de trabajo de 100 a 10 μ L
- Micropipeta con un rango de trabajo de 1 a 10 μ L
- Puntas para la micropipeta
- 217 Eppendorf de 2 mL
- 2 Pipetas de 20 mL de capacidad.
- 10 Pipetas Pasteur de plástico
- 14 Tubos centrifuga o tubos Falcon
- 15 Frascos ISO de 100 mL
- 1 Espátula
- Papel de plata
- Cinta adhesiva
- Celo
- Pinza metálica
- Espátula
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- 2 jeringuillas de 10 mL
- Cúter
- Tijeras
- Pie de rey
- Imán agitador
- Molde de Teflón
- *Parafilm*

6.2 MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS

La tabla 3 recoge los instrumentos y equipos utilizados en el procedimiento experimental del trabajo.

Tabla 3. Equipos empleados en el proceso experimental

Equipo empleado	Especificaciones
Espectrofotómetro	Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis
Sonicador	Bandelin Sonoplus HD 3100 ultrasonic homogeneizer
Microscopia SEM	JOEL JSM 6300
Liofilizadora	Telstar LyoQuest
Bomba para jeringuillas	NE 1000 higher ressure programable single syringe pump
Fuente de alta tensión	FR Series 300 Watt regulated high voltaje power supplies
Vórtex	IKA Vórtex Genius 3
Microtest	Microtest electromecánica SCM3000 95
Balanza de precisión	Mettler Toledo XS105 Dual Range
Desecador	Vacuo-Temp. P Selecta
Baño termostático	Unitronic OR. P Selecta
Reómetro	Discovery HR-2 Hybrid Rheometer (TA Instruments)

Las imágenes de todos estos equipos empleados pueden observarse en las figuras adjuntadas en el ANEXO I al final del documento.

6.3 REACTIVOS EMPLEADOS

En la siguiente tabla 4 se enumeran y detallan los reactivos empleados durante la realización experimental. Se indica el nombre del producto empleado y el nombre de la casa donde ha sido comprada así como su referencia comercial.

Tabla 4. Reactivos empleados durante el procedimiento experimental

Reactivo empleado	Marca comercial	Referencia comercial
Ácido hialurónico de Streptococcus equi	SIGMA - ALDRICH	T2879
Hidrocloreuro de tiramina	SIGMA - ALDRICH	T2879
MES	SIGMA - ALDRICH	M3671
NaCl	SIGMA - ALDRICH	131659
NaOH	SIGMA - ALDRICH	71692
EDC	IRIS - BIOTECH	RL-1022.0025
NHS	SIGMA - ALDRICH	130672
Membrana de diálisis Spectra for 3 MWCO 3500 espesor 45 mm	SPECTRUM LABS	132724
Hidrocloreuro de tetraciclina	SIGMA - ALDRICH	T7660
Ácido poliláctico (PLLA)	NATUREWORKS	2500HP
Horseradish peroxidase (HRP)	SIGMA - ALDRICH	P8375
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	SIGMA - ALDRICH	H1009
Acetona	SCHARLAB	AC0310007E
Cloroformo	SCHARLAB	PS06830010
Azida de sodio	SIGMA - ALDRICH	S2002

6.4 MONTAJE Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental completo se ha representado con detalle en forma de diagrama de bloques en la figura 16. Se observa en cada bloque la parte del proceso experimental que se ha realizado. Por una parte se llevó a cabo la síntesis del ácido hialurónico modificado con tiramina para el posterior entrecruzamiento y obtención del hidrogel. Por otro lado, a partir de una emulsión realizada con cierta cantidad de fase polimérica y cierta de fase acuosa, se sintetizaron las membranas de *electrospinning* con la propiedad de contener en ellas el fármaco que se desea liberar en las zonas dañadas de la piel. Una vez realizadas estas dos síntesis se realizó el entrecruzamiento in-situ de los hidrogeles conteniendo en ellos la membrana de *electrospinning* en la parte superior del hidrogel. En los últimos ensayos una vez obtenido el hidrogel se pretendió estudiar la liberación de la tetraciclina desde la membrana de *electrospinning* y a través del hidrogel. Se varió la concentración del hidrogel para evaluar la influencia de este parámetro en el proceso de liberación. Finalmente se caracterizó el constructo hidrogel-membrana mediante la medición sus propiedades mecánicas.

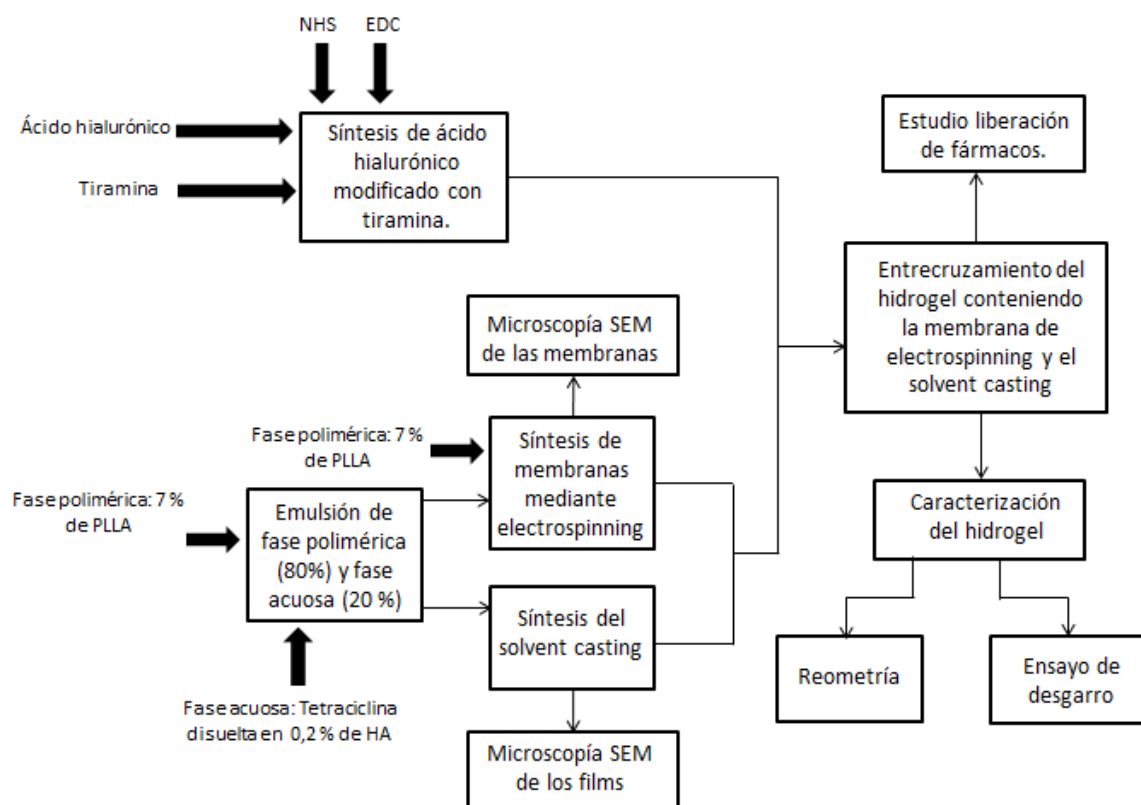


Figura 16. Diagrama de bloques del procedimiento experimental empleado.

En base a este diagrama de bloques, los montajes y procedimientos experimentales realizados se describen a continuación.

6.4.1 Síntesis del ácido hialurónico modificado con tiramina

Los ratios molares de reactivos se muestran en la tabla 5

Tabla 5. Ratios molares empleados en el procedimiento para injertar tiramina en ácido hialurónico.

Tyr : COOH	EDC : COOH	EDC : Tyr	NHS : EDC
2:1	1:1	1:2	1:10

En cada síntesis se preparó 20 mL de disolución de ácido hialurónico de 5 mg/mL. En base a la tabla 5 y conociendo los pesos moleculares de todos los reactivos se puede calcular las cantidades necesarias a añadir de cada reactivo. Estas cantidades se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Masas empleadas para el procedimiento para injertar tiramina en ácido hialurónico.

Masa de ácido hialurónico (HA) (mg)	Masa de tiramina (Tyr) (mg)	Masa de EDC (mg)	Masa de NHS (mg)
100,00	86,54	47,77	2,87

En primer lugar se preparó 20mL de una disolución de cloruro de sodio (NaCl) 150 mM en agua ultrapura a la que se añadió 1,08 g de MES (276mM en la disolución final) y 0,3 mL de NaOH con una concentración de 5 M (quedando así 75 mM en la disolución final).

Se ajustó el pH de la disolución a 5,57 y se añadieron 100 mg de HA, poco a poco y en continua agitación para su disolución paulatina. Se mantuvo la disolución en agitación durante 2 horas a 500 rpm y temperatura ambiente para garantizar su completa disolución. Como el HA es fotosensible, en todo el procedimiento experimental posterior se cubrió el vaso de precipitado de la disolución con papel de aluminio para evitar su contacto con la luz.

Transcurridas las 2 horas, se añade el hidrocloreuro de tiramina y se mantuvo la disolución en agitación 20 minutos a temperatura ambiente y a 500 rpm.

Una vez bien disuelta la tiramina se ajustó el pH a 5,75 y se añadió la cantidad indicada de NHS, mantenido la disolución en agitación durante 30 minutos a 500 rpm y temperatura ambiente.

Por último se añadió la EDC y se dejó reaccionar durante 24 horas en agitación continua a 500 rpm y a una temperatura de 37°C.

Transcurridas las 24 horas, se purificó el producto mediante diálisis con una membrana Spectra for 3 MWCO 3500, durante 2 días realizando 3 lavados al día. Los primero 3 lavados se realizaron con una

disolución de NaCl 150 mM en agua ultrapura, empleando 2,5 litros. Los 3 lavados del siguiente día se realizaron con 2,5 litros de agua desionizada.

El procedimiento de lavado se realizó introduciendo el ácido hialurónico ya modificado con la tiramina en la membrana de diálisis, guardando 5 cm de margen por arriba y por abajo. Después, se enrolló por ambos extremos mediante pliegues de igual distancia. Estos pliegues se sellaron con pinzas de plástico, evitando el escape del producto durante el lavado (figura 17). Finalizado este montaje se introduce la membrana en el vaso de 2,5 L en agitación por imán magnético de tal forma que quede la membrana de diálisis flotando en la disolución y en rotación constante por el remolino formado en agitación para aumentar el rendimiento del lavado.



Figura 17. Ácido hialurónico modificado con tiramina en membrana de diálisis para su lavado.

Tras la diálisis se filtra la disolución cuidadosamente (ya que el ácido hialurónico es muy viscoso), para eliminar cualquier resto de la disolución. Se guardó en un tubo Falcon de 50 mL cubierto siempre por papel de aluminio y se congeló inmediatamente a una temperatura de -80°C para su liofilización. La liofilización se realizó durante 3 días, obteniéndose el producto final de la figura 18.



Figura 18. Imagen del resultado de la síntesis del ácido hialurónico injertado con tiramina.

6.4.2 Procedimiento para la cuantificación del grado de sustitución de la tiramina en el ácido hialurónico.

Una vez realizado el proceso de obtención de ácido hialurónico modificado con tiramina es imprescindible comprobar si esta última ha sido injertada correctamente en las cadenas del ácido hialurónico y en caso afirmativo determinar la cantidad injertada. Para la cuantificación del grado de injerto de tiramina se empleó el espectrofotómetro UV. La medición de la absorción se efectuó a una longitud de onda de 275 nm ya que esta longitud de onda es la adecuada para identificar los grupos fenol de la tiramina y estos grupos son los que quedan como radicales de las cadenas tras la reacción de sustitución.

Para la preparación de la muestra se disolvió en un eppendorf 1 mg de ácido hialurónico modificado con tiramina en 1 mL de agua desionizada. De este modo se obtiene una concentración de HA-Tyr de 1 mg/ mL. Antes de la lectura en el espectrómetro de la muestra, se deja 24 horas en nevera para su correcta disolución.

Transcurridas estas 24 h se lee en el espectrómetro la absorbancia de la muestra y se obtiene así la concentración de tiramina en 1 mL de muestra.

En base a esto se calcula, con los pesos moleculares del ácido hialurónico y la tiramina y conociendo sus ratios molares, el grado de sustitución de la tiramina en el HA.

Para este procedimiento se sintetizaron 3 lotes de ácido hialurónico modificado con tiramina y se calculó el grado de injerto de todos ellos para su comparación.

6.4.3 Ensayo de reometría

El ensayo de reometría es un ensayo dinámico de caracterización de hidrogeles que permite determinar el módulo mecánico de cizalla de los hidrogeles bajo determinadas condiciones de deformación. Además, si el proceso de gelificación de los hidrogeles se realiza en los platos del equipo, permite registrar la evolución del módulo mecánico en función del tiempo y se puede determinar de forma precisa el tiempo de gelificación del hidrogel.

Para la preparación de las muestras a tomar en el ensayo de reometría se prepararon 350 μ L de hidrogel disuelto en DPBS. Para el entrecruzamiento del hidrogel, se empleó el mismo procedimiento que el empleado más adelante en el apartado 6.4.8 para entrecruzar los constructos de membrana-hidrogel. De esta forma, se asemejó este proceso a los ensayos posteriores para obtener las mismas condiciones de entrecruzamiento. Se aplicaron las mismas concentraciones y los mismos porcentajes de reactivos que los de la tabla 11 del procedimiento comentado. En base a estos porcentajes se añadió 43,75 μ L de HRP. Con respecto al sustrato de H_2O_2 se mantuvieron los 125 μ L empleados en el entrecruzamiento para la liberación de fármaco. Se aplicó pues la misma cantidad de H_2O_2 a una concentración ajustada de 49,37 mM (debido a que en este caso tenemos menor cantidad de hidrogel que en los entrecruzamientos de los constructos).

La reticulación del hidrogel se realizó directamente en el plato del equipo para determinar de forma precisa el tiempo de gelificación del hidrogel. Para ello, se realizó el ensayo de reometría rotacional

sobre las muestras al 1% y 2% de HA, utilizando el reómetro Discovery HR-2 Hybrid Rheometer (TA Instruments). Se utilizó como soporte una geometría de platos paralelos y un vástago de acero inoxidable de 20 mm de diámetro, la distancia entre el plato y el vástago (GAP) fue de 1,5 mm para todas las muestras. Para emular la temperatura del cuerpo humano, el ensayo se desarrolló a 37°C. Se programó un barrido rotacional de 20 minutos de duración en cada muestra con una deformación al 1% con una frecuencia de 1 Hz. Pasado este tiempo se añadió dos barridos de medida, el primero consistió en un barrido de deformación a 1 Hz y el segundo en un barrido de frecuencia con una deformación del 1%, para caracterizar los hidrogeles una vez gelificados.

Se realizaron 3 muestras al 1% de HA y 3 muestras al 2% de HA. Para mayor precisión en la medida del tiempo de gelificación se cronometró el tiempo transcurrido desde la deposición de la última gota de sustrato hasta el comienzo de la medida del reómetro obteniendo de media a sumar en los resultados un tiempo de 20 segundos.

6.4.4 Procedimiento para la realización de la emulsión.

Para la síntesis de la membrana de *electrospinning* que contenga en el interior de sus poros cierta cantidad de tetraciclina, se preparó una emulsión de la disolución acuosa del antibiótico en una disolución orgánica del polímero PLLA. A partir de 20 mL de emulsión se preparó las membranas de *electrospinning* y también films de control mediante el método de *solvent casting*.

La figura 19 muestra un esquema que ilustra el procedimiento seguido, indicando los porcentajes tomados de cada fase y su cantidad. El procedimiento seguido para la fabricación se describe en los apartados siguientes 6.4.5 y 6.4.6.

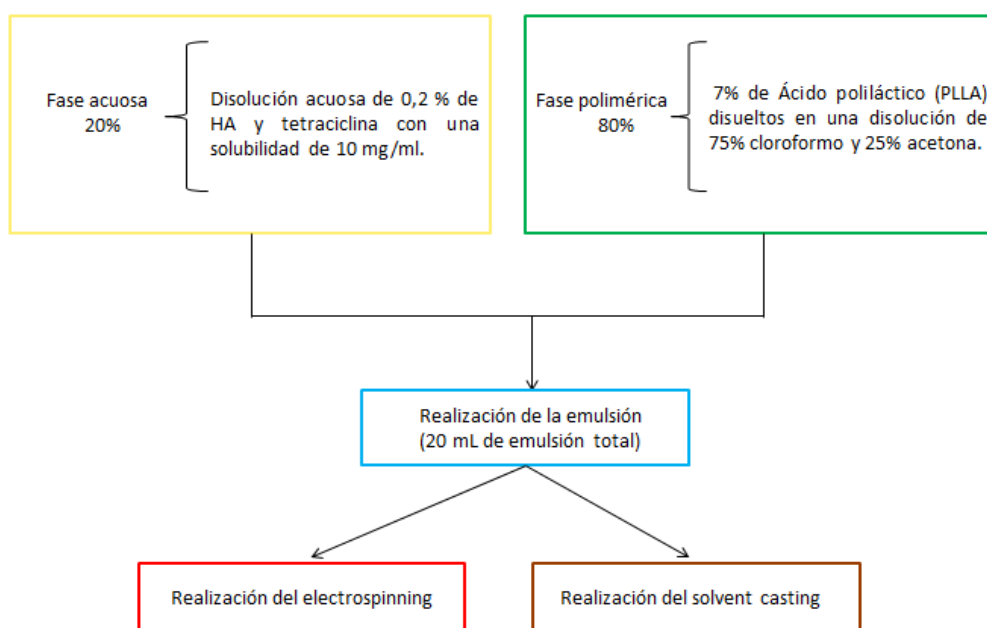


Figura 19. Esquema para la preparación de la emulsión con fase polimérica y fase acuosa que contiene la tetraciclina para la posterior fabricación de la membrana de *electrospinning* o el film de *solvent casting*.

Preparación de la fase acuosa

Para la preparación de la fase acuosa se preparó en primer lugar una disolución de 10 mL de ácido hialurónico en agua desionizada, esta disolución será el disolvente de la tetraciclina como fase acuosa. La concentración de ácido hialurónico en el agua desionizada fue de 0,2% para conferir la viscosidad adecuada a la emulsión para facilitar la incorporación en la fase orgánica de PLLA.

De este modo, se tomaron 20 mg de ácido hialurónico y se llevaron a 10 mL de agua desionizada, vertiendo el ácido hialurónico poco a poco y en agitación continua hasta su completa disolución.

Seguidamente, sabiendo de la figura 19 que se quiere preparar 20 mL de emulsión y que la fase acuosa representa un 20% de la misma, se preparó 4 mL de tetraciclina en la disolución anterior. La solubilidad de la tetraciclina es de 10 mg/mL, y para facilitar la disolución de la tetraciclina en el ácido hialurónico, se prepararon 4 eppendorfs de 10 mg de tetraciclina cada uno. A estos cuatro eppendorfs con tetraciclina se les añadió 1 mL de disolución de ácido hialurónico preparada en la etapa inicial y se agitaron manualmente hasta la completa disolución de la tetraciclina en cada muestra. Posteriormente se juntó el contenido de los 4 eppendorfs en un vaso de precipitados consiguiendo así una disolución homogénea, como se puede observar en la figura 20.

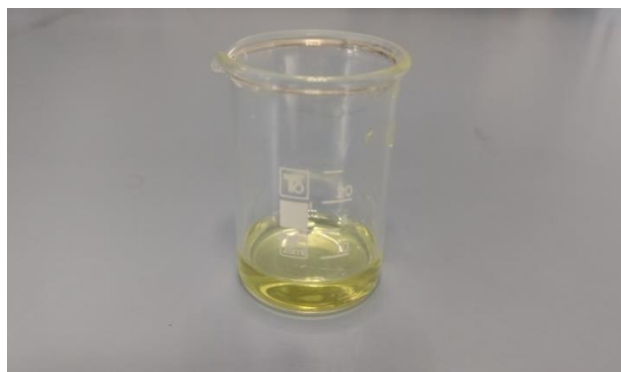


Figura 20. Fase acuosa de la emulsión formada por 4 mL de tetraciclina disuelta en una disolución acuosa de ácido hialurónico al 0,2%

Preparación de la fase polimérica

En la preparación de la fase polimérica se prepararon 20 mL de una disolución de ácido poliláctico (PLLA) con una concentración del 7% empleando como disolvente una disolución al 75% de cloroformo y al 25% de acetona. El cloroformo se emplea porque es un buen disolvente del PLLA y la acetona se emplea para aportar polaridad a la disolución polimérica para el proceso de *electrospinning*. Es necesario dotar a la disolución de cierta polaridad (el cloroformo posee muy baja polaridad) para que durante el proceso de *electrospinning*, el jet formado se sienta atraído por el polo negativo.

Para la preparación de 20 mL de PLLA al 7% se necesitan 1,4 gramos de PLLA. Estos se disuelven en una disolución de 20 mL de los cuales 15 mL son de cloroformo (75%) y 5 mL de acetona (25%). Es necesario mantener la disolución en agitación durante 24 horas para la completa disolución del PLLA. Además, debido al cambio de volumen que supone la disolución del PLLA, se añadieron inicialmente 3 mL de acetona y tras las 24 horas se enrasó la disolución obtenida con acetona hasta los 20 mL.

Una vez preparada la fase polimérica de la emulsión, se tomarón 16 mL de ella que se corresponde al porcentaje correspondiente de fase polimérica en 20 mL de emulsión total. La figura 21 muestra dicha cantidad de polímero en un tubo Falcon de 50 mL donde posteriormente se realizó la emulsión.



Figura 21. Fase polimérica de la emulsión formada por 16 mL de ácido poliláctico con una concentración del 7% disuelto en una disolución de cloroformo (75%) y acetona (25%)

Preparación de la emulsión

Una vez preparada tanto la fase acuosa como la fase polimérica se procedió a la realización de la emulsión. En primer lugar se mezclaron las dos fases en un tubo Falcon. Se identifica con precisión en la figura 22 las dos fases antes de ser agitadas, siendo la fase polimérica la más densa y la fase acuosa la menos densa y con un color amarillo.

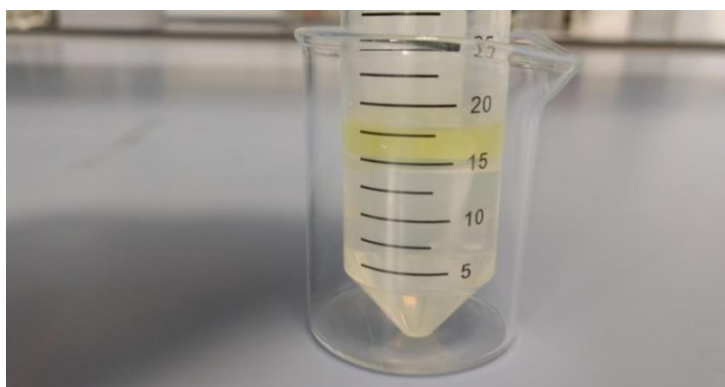


Figura 22. Fase polimérica y fase acuosa de la emulsión antes de agitación y mezcla. La fase superior de color amarillento se corresponde a la fase acuosa y contiene la tetraciclina y la fase inferior se corresponde con la fase polimérica.

Una vez se obtuvieron las dos fases se realizó la emulsión. Para ello se mezcló minuciosamente la disolución en un vórtex de laboratorio (IKA ® VORTEX, GENIUS 3) hasta conseguir una única fase en la disolución sin presencia de grumos de polímero en su interior (figura 23)

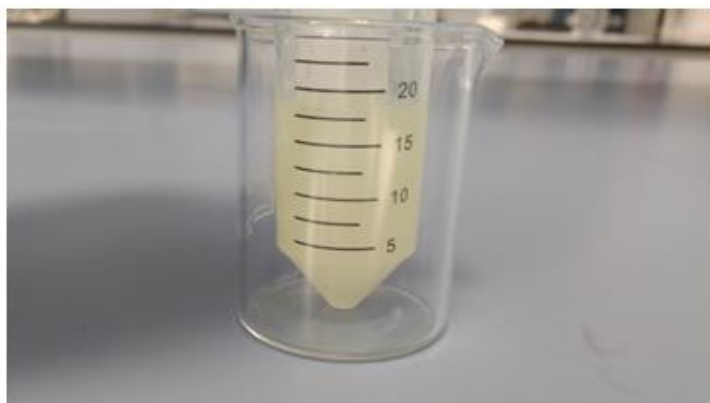


Figura 23. Emulsión con fase acuosa y polimérica homogeneizada mediante agitación en vórtex

Para acabar de formar la emulsión, se empleó un sonicador. La alta intensidad aportada por el sonicador aporta la energía necesaria para dispersar las gotas que forman la emulsión (fase dispersa) en la fase continua.

Se introdujo la emulsión en un vaso de precipitados de 50 mL. Dicho vaso de precipitado se introdujo en otro vaso de capacidad superior con hielos troceados en su interior y con bastante cantidad de sal de forma que el vaso de la emulsión quedase completamente rodeado por el hielo. De esta forma se consigue mantener la emulsión a una temperatura muy baja durante todo el proceso de sonicación para evitar en la medida de lo posible la degradación de la disolución con la tetraciclina.

Las condiciones que se emplearon en el sonicador fueron las mostradas en la siguiente tabla 7:

Tabla 7. Condiciones empleadas en el sonicador

Condición	Valor
Tiempo total de sonicación (min)	2
Pulsaciones de encendido (seg)	0,2
Pulsaciones de apagado (seg)	0,4
Potencia (W)	40

La figura 24 nos muestra una imagen del resultado de la emulsión obtenida una vez tratada con el sonicador.



Figura 24. Imagen de la emulsión después de tratamiento con sonicador

6.4.5 Preparación de los films de control por solvent casting.

La preparación de las membranas de *solvent casting* se realizó a partir de la emulsión preparada. Se preparó además una muestra control a partir de la fase polimérica compuesta únicamente por PLLA disuelto en cloroformo y acetona. Se tomaron 2 mL de estas disoluciones con una micropipeta y se colocaron en la superficie circular de una placa Petri de plástico. Esta técnica consiste en dejar reposar esta cantidad de emulsión (o disolución de polímero) durante 24 horas bajo campana extractora para la evaporación de los solventes orgánicos utilizados. Al cabo de este tiempo se obtuvo un film de color amarillento (color característico de la tetraciclina) para el film de *solvent casting* con emulsión y un film de color blanco, para el film de *solvent casting* de PLLA puro. En las figuras 25 y 26 se puede ver una fotografía de los films preparados.

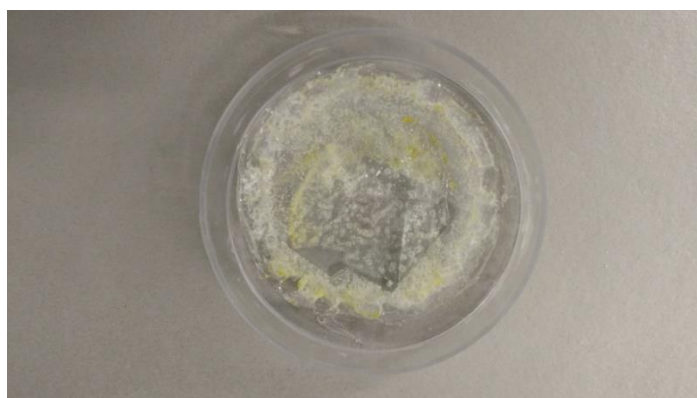


Figura 25. Imagen de la membrana *de solvent casting* sintetizada a partir de la emulsión realizada con fase polimérica de PLLA al 7% disuelto en una disolución de cloroformo-acetona y con fase acuosa formada por tetraciclina disuelta en HA 0,2%.



Figura 26. Imagen de la membrana de *solvent casting* realizada a partir de la fase polimérica formada por PLLA al 7% disuelto en una disolución de cloroformo - acetona.

6.4.6 Preparación de las membranas mediante *electrospinning*.

Se preparó dos tipos de membranas, de PLLA puro y de PLLA cargado con tetraciclina, esta última fabricada a partir de la emulsión.

El esquema de la figura 27 muestra el proceso de preparación de ambas membranas.

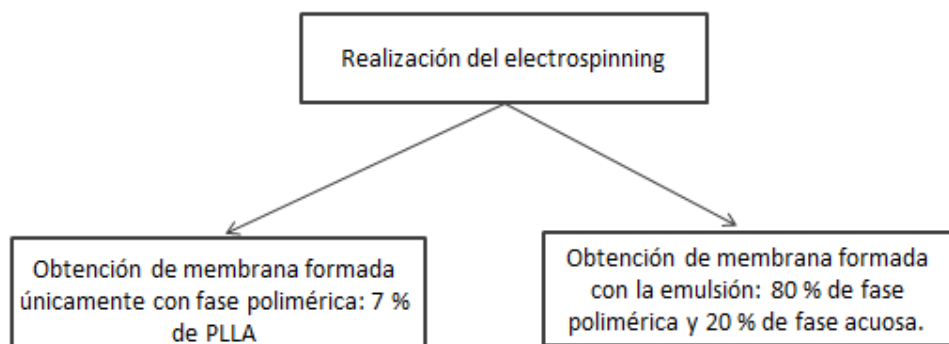


Figura 27. Esquema de las membranas realizadas mediante *electrospinning* con sus diferentes disoluciones empleadas.

Las condiciones óptimas del equipo para la correcta obtención de las diferentes membranas de *electrospinning* se indican en la tabla 8, y fueron determinadas en el contexto del Trabajo Final de Grado de mi compañero [41].

Tabla 8. Condiciones de equipo de *electrospinning* empleadas

Condición	Valor
Distancia desde la punta de la jeringuilla hasta el colector (cm)	14
Voltaje de la fuente de alimentación (KV)	18
Flujo saliente de la bomba (mL/hr)	1
Concentración de PLLA (%)	7

En los apartados siguientes se describe en proceso experimental seguido para la fabricación de las membranas. En primer lugar se explica el montaje del colector donde se deposita la membrana, después se explica con detalle cómo se realizó el montaje del ánodo y del cátodo antes de poner en marcha el proceso para acabar describiendo el funcionamiento del proceso en su totalidad.

Preparación y montaje del colector para el ensayo de *electrospinning*.

El colector es una parte muy importante en cualquier proceso de *electrospinning* ya que es en él donde se deposita la membrana. Se eligió un colector plano, rectangular y formado por una placa metálica. En la parte trasera de esta placa se pegaron dos varillas de cobre con silicona para conectar en ellas el cátodo para el montaje del *electrospinning*. En la figura 28 se observan dos imágenes de la parte delantera (la de izquierda) y trasera (la de la derecha) de esta placa metálica.



Figura 28. Imagen de la parte delantera y trasera de la placa metálica en el montaje del colector para el proceso de *electrospinning*.

Después, se envolvió la parte delantera de la placa en papel de aluminio y se pegó con celo una superficie de teflón dejando un recuadro visible del papel de aluminio en el centro de la placa, para la deposición de las fibras. Al formar una superficie concreta para la deposición de las fibras se facilita la posterior recogida de la membrana ya que las fibras están depositadas en un lugar concreto. La figura 29 muestra el montaje del colector con el papel de aluminio y la placa de teflón pegada a la parte delantera de la placa metálica (imagen de la izquierda). En esta misma figura 29 se observa el montaje completo con el colector sobre la estructura de corcho montada con el fin de mantener de forma vertical el colector durante el proceso de *electrospinning* (imagen de la derecha).

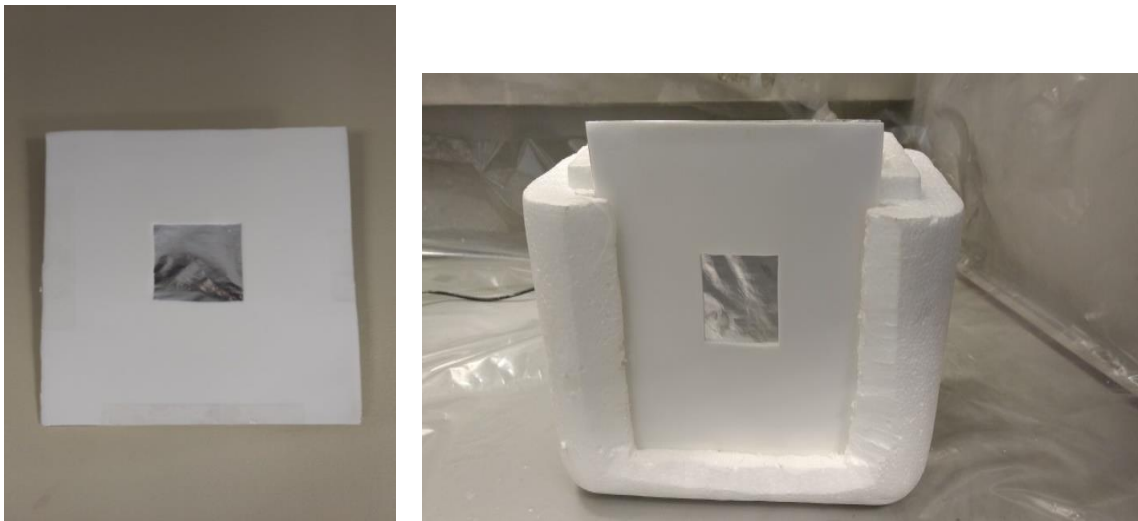


Figura 29. Imagen del montaje completo del colector y montaje del colector sobre el soporte de corcho para el proceso de *electrospinning*

Se conectó posteriormente el ánodo y del cátodo del equipo. Para ello se parte de una fuente de alimentación que nos proporcionará el voltaje deseado para el funcionamiento del circuito. En los siguientes apartados se describe el proceso seguido para el montaje del ánodo y del cátodo.

Preparación y montaje de ánodo para ensayo de *electrospinning*.

Para el correcto montaje del ánodo, se inyectaron en una jeringuilla 2 mL de la disolución preparada ya sea de disolución con emulsión o solo con fase polimérica. A esta jeringuilla se le introduce una aguja de un diámetro inferior para disminuir el tamaño de la gota que será depositada en el *electrospinning*. La jeringuilla se introduce en una bomba que empujará el pistón de la jeringuilla para controlar el flujo de disolución saliente. Una vez asegurada que la jeringuilla está fijada a la bomba por todos sus agarres de seguridad se conecta el cable de la fuente de alimentación correspondiente al ánodo en la aguja de la jeringuilla. De esta forma se obtuvo el montaje del ánodo (figura 30).



Figura 30. Montaje del ánodo para el proceso de *electrospinning*.

Preparación y montaje de cátodo para proceso de *electrospinning*.

Para el montaje del cátodo se conectó el polo de la fuente de alimentación correspondiente al cátodo en el cable de cobre que se fijó a la parte trasera del colector. De este modo se conecta el polo negativo a la placa metálica conductora donde ha de ser depositada la membrana (figura 31)

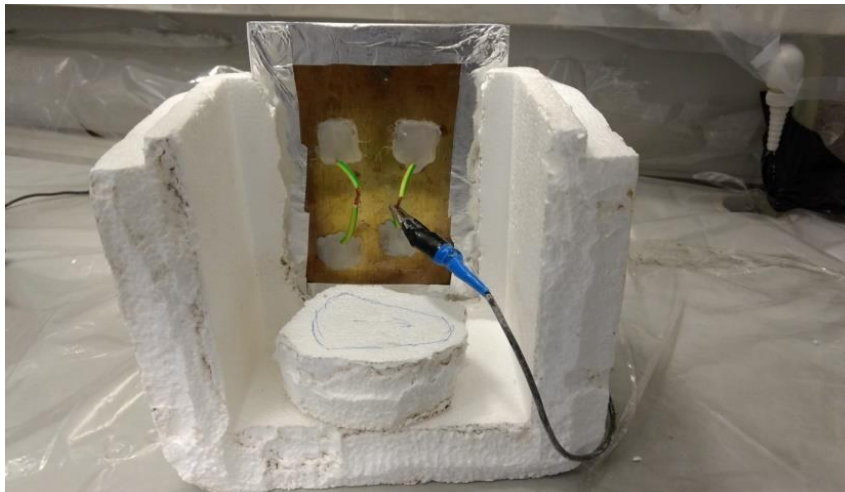


Figura 31. Montaje del cátodo para el proceso de *electrospinning*

Montaje completo del proceso de *electrospinning*.

En la figura 32 se observa el montaje completo de *electrospinning*. El empuje de la bomba a la velocidad de 1mL/h y la aguja colocada en la jeringuilla permiten la formación de una micro gota cada cierto tiempo determinado. El campo eléctrico creado mediante el cátodo y el ánodo permiten la evaporación de los solventes de la emulsión y la formación de un electrohilado que se deposita en la sección rectangular del papel de aluminio en el colector. Es necesario el continuo limpiado de la punta de la aguja con una varilla recubierta con papel para la eliminación de la gota residual que se forma en la punta de esta aguja y que puede obstruir el paso de la jeringuilla. Al cabo de 2 horas de proceso de *electrospinning* se obtuvo una membrana de *electrospinning* con un cierto grosor. En la figura 33 se observa una imagen del producto obtenido sobre el papel de aluminio después del proceso de *electrospinning*.



Figura 32. Montaje completo del proceso de *electrospinning*



Figura 33. Membrana final obtenida en el proceso de *electrospinning*

6.4.7 Morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se caracterizó la morfología de las diferentes membranas obtenidas y los films de control mediante microscopía diferencial de barrido (SEM). Para ello se troquelaron las muestras en pequeños fragmentos y se pegaron al puertamuestras con una cinta adhesiva de carbono de doble cara. Para asegurar la conductividad del haz de electrones en el microscopio se estableció además un puente de grafito entre la muestra y el portamuestras. La superficie se recubrió con platino mediante una descarga de plasma en el equipo preparado para ello del Servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València. La figura 34 muestra las muestras preparadas para su observación al SEM.



Figura 34. Imagen del soporte con los portamuestras tras la preparación inicial de las muestras para su caracterización mediante microscopía SEM

Las imágenes se tomaron con una diferencia de potencial aplicada en el equipo de 1Kv. La tabla 9 recoge los detalles de las fotografías realizadas y la cantidad de muestras que se estudiaron. Una vez obtenidas las imágenes, para el estudio de la distribución de los diámetros de las fibras, se realizaron 30 mediciones del diámetro de fibras diferentes para cada una de las 4 fotos tomadas. La medición de estos diámetros se realizó mediante el empleo del programa ImageJ.

Tabla 9. Tabla resumen del contenido, el número de fotos realizadas y el número de aumentos de las fotos en cada muestra empleando el microscopio SEM

Número de la muestra	Descripción del contenido del portamuestras	Número de fotos realizadas en SEM por cada muestra	Número de aumentos en SEM por muestra cada muestra
1	Membranas <i>electrospinning</i> sin emulsión	4	19 000
		4	2 000
2	Membranas <i>electrospinning</i> con emulsión	4	19 000
		4	2 000
3	Film de <i>solvent casting</i> formado con la emulsión	1	19 000
		1	2 000

6.4.8 Procedimiento para el entrecruzamiento del hidrogel conteniendo las membranas de *electrospinning* y *solvent casting*

En este proceso se realizó el entrecruzamiento del hidrogel y su ensamblado con las membranas de *electrospinning* y films de *solvent casting* para la fabricación de los constructos hidrogel - membrana.

Montaje de los soportes empleados para el entrecruzamiento.

Una vez sintetizado el ácido hialurónico con injerto de tiramina y las membranas de *electrospinning* con emulsión, el siguiente procedimiento llevado a cabo fue el entrecruzamiento in situ del hidrogel conteniendo por un lado, la membrana de *electrospinning*, y por otro el film de *solvent casting* realizado. De esta forma se podrá comparar en el estudio posterior la efectividad de la liberación del fármaco tanto contenido en la membrana como en el film.

Para ello se construyeron en primer lugar los soportes donde se realizó la gelificación del hidrogel. Lo primero a tener en cuenta es que se realizaron dos tipos de hidrogeles variando la concentración de ácido hialurónico que forma el hidrogel. Se estudió así cómo afecta la concentración del hialurónico, empleando concentraciones al 1% y 2%. Para ello se construyeron 24 soportes. El contenido y la diferencia de los hidrogeles sintetizados en cada uno de los soportes se pueden ver en la tabla 10.

Tabla 10. Contenido de los soportes creados para el entrecruzamiento in-situ del hidrogel variando la concentración de ácido hialurónico modificado con tiramina.

Enumeración de soportes	Contenido de los soportes
1,2,3,4	Film emulsionado al 0,2% sin hidrogel para control del proceso.
5,6,7,8	Membrana de <i>electrospinning</i> emulsionada al 0,2% sin hidrogel para control del proceso.
9,10,11,12	Film emulsionado al 0,2% contenido en hidrogel al 1 % de HA - Tyr.
13,14,15,16	Membrana de <i>electrospinning</i> emulsionada al 0,2 % contenida en hidrogel al 1% de HA -Tyr.
17,18,19,20	Film emulsionado al 0,2% contenido en hidrogel al 2% de HA - Tyr.
21,22,23,24	Membrana de <i>electrospinning</i> emulsionada al 0,2% contenida en hidrogel al 2% de HA -Tyr.

Por otra parte, se pretendió que los hidrogeles tuvieran una superficie de $0,1 \text{ cm}^3$ por ello se realizaron soportes cuadrados de 1 cm por 1 cm de lado para introducir en ellos las mismas medidas de las membranas recortadas. Del mismo modo, para conseguir esta superficie de 1 cm^3 el espesor del hidrogel debía ser de $0,1 \text{ cm}^3$ que en términos de volumen equivale a $0,1 \text{ mL}$ ($100 \mu\text{L}$). Esta fue la cantidad necesaria de ácido hialurónico modificado con tiramina (HA-Tyr) que se añadió a los moldes para conseguir el volumen de hidrogel deseado. En la figura 35 se observa una foto de los 24 soportes.



Figura 35. Soportes de 1cm x 1cm para el entrecruzamiento del hidrogel de ácido hialurónico modificado con tiramina con las membranas emulsionadas de *electrospinning* y con el film de *solvent casting*.

Preparación de la disolución de HRP y de H₂O₂ en DPBS.

Para el entrecruzamiento del hidrogel es necesario el empleo de la enzima Horseradish Peroxidase (HRP) que actúa como catalizador. Esta enzima reacciona con el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y facilita el entrecruzamiento al ser el sustrato de la enzima empleada. Para ello se prepara una disolución de HRP disuelta en DPBS que es el buffer de pH y fuerza iónica de esta reacción y ofrece un medio salino de disolución que se asemeja a la concentración osmótica ya a la concentración iónica del cuerpo humano. La concentración requerida de HRP en DPBS fue de 12,5 U/mL y la concentración de H₂O₂ disuelto también en DPBS fue de 20 mM.

Llenado de los poros de las membranas de *electrospinning* con disolución de DPBS.

Es importante impregnar los poros de las membranas (únicamente se emplean en este proceso las membranas de *electrospinning*) con el buffer empleado en el ensayo, para forzar que las primeras partículas inmersas en las fibras porosas se liberen en la disolución. Para realizar esto se empleó el equipo de bomba de vacío.

Se realizaron 7 ciclos de vacío de las membranas situadas en eppendorfs de 1,5 mL de capacidad rellenos con 1 mL de DPBS. Un ciclo de vacío supone, una vez introducidas las muestras en el equipo, crear el vacío en el interior hasta que las disoluciones comiencen a burbujear momento en el cual se rompe el vacío abriendo suavemente la válvula y permitiendo la entrada de aire en el interior de la campana de vacío. Las membranas flotan en el medio debido a su baja densidad respecto al medio salino, por ello mediante los ciclos de vacío se busca hundir el material hasta el fondo del medio acuoso ya que esto supone que el aire ha salido por completo del interior de los poros y se han llenado de disolución líquida para que luego se impregne bien con el gel.

Proceso de entrecruzamiento del hidrogel.

Antes del entrecruzamiento se pesaron todas las membranas de *electrospinning* y *solvent casting* para el posterior proceso de liberación de fármaco ya que una vez entrecruzado el hidrogel no es posible determinar el peso de las membranas al estar en el interior del hidrogel.

Para entrecruzar el hidrogel, los porcentajes en volumen de las cantidades preparadas en los moldes para la síntesis del hidrogel son los mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje en volumen de los productos tomados para la síntesis del hidrogel.

Nombre de la disolución necesaria	Porcentaje en volumen (v/v)
Disolución de ácido hialurónico al 1% y 2%	88,9%
Disolución de HRP 12,5 U/mL	11,1%
Disolución de H ₂ O ₂ 20 mM	11,1% en exceso

El primer paso para el entrecruzamiento del hidrogel y para conseguir estos porcentajes es la preparación de la mezcla de HRP en HA-Tyr disuelto en DPBS, al 1% y 2%. Se preparó 1 mL de HA-Tyr en DPBS lo que representa el 88,9% del volumen total. Se calculó así que el 11,1% de HRP a añadir a esta disolución corresponde a un volumen de 125 µL. Por lo tanto se añade este volumen a la disolución de 1 mL HA-Tyr tanto al 1% como al 2%. Una vez obtenida esta mezcla se realizó el proceso de entrecruzamiento:

En primer lugar se extendieron 25 µL de mezcla de 1% o de 2% únicamente en los soportes adecuados según la numeración y atendiendo a la tabla 5 anterior. A pesar de que se ha explicado que la cantidad necesaria de esta mezcla para conseguir la superficie necesaria de hidrogel es de 100 µL, se añadió esta pequeña cantidad inicial para impregnar la superficie de gel y evitar el contacto directo de la membrana con el soporte de teflón.

Seguidamente, se introduce la muestra, ya sea el film de *solvent casting* o las membranas de *electrospinning* en los soportes adecuados de nuevo siguiendo la tabla 5 anterior. Se añaden inmediatamente después los 100 µL de mezcla preparada de HA-Tyr en los soportes adecuados según su concentración. Por último, para conseguir el entrecruzamiento del hidrogel se añaden 125 µL de H₂O₂ que representan el 11,1% en exceso del volumen final del hidrogel. Una vez añadido todos los reactivos se espera aproximadamente 10 minutos a la formación completa del hidrogel comprobando con suavidad a cada minuto el posible entrecruzamiento del hidrogel. En la figura 36 se puede observar la síntesis de los hidrogeles al 1% y 2% tanto con los films de *solvent casting* en su interior como con las membranas de *electrospinning*.

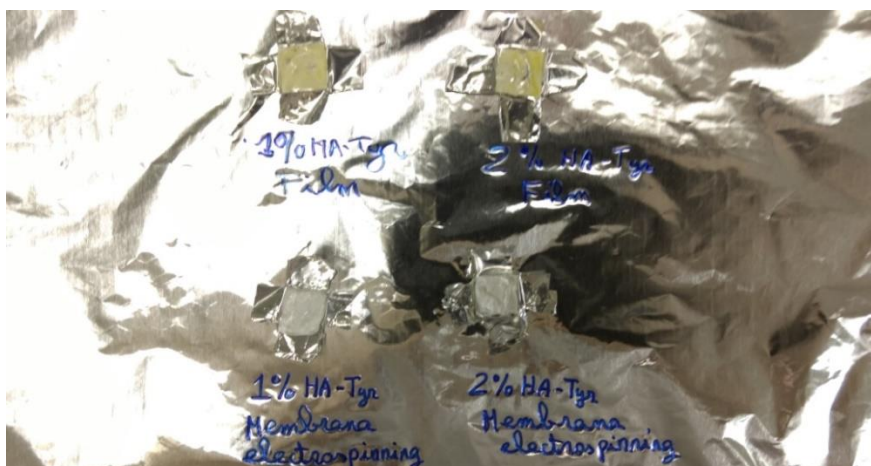


Figura 36. Imagen de la síntesis de los hidrogeles de ácido hialurónico con tiramina tanto al 1% como al 2% conteniendo en el interior de su estructura los films de *solvent casting* y las membranas de *electrospinning* para cada concentración.

Este procedimiento se ha explicado para el entrecruzamiento de las membranas sintetizadas a partir de la emulsión pero, una vez realizado este procedimiento se realiza exactamente los mismos pasos pero con las membranas de *electrospinning* y *solvent casting* sin tetraciclina, de esta forma se podrá comparar ambos resultados llevando un control del mismo proceso sin tetraciclina. Se pretende además comprobar que la longitud de onda a la que se midió la absorbancia de la tetraciclina es la correcta ya que la longitud de onda a la que se lee la tiramina es solo un punto inferior a la de la tetraciclina. De este modo se asegura observar las posibles interferencias que haya habido y comprobar que la medición de la liberación del fármaco es la correcta.

6.4.9 Sistema de liberación de la tetraciclina del hidrogel

El sistema de liberación de fármacos consiste en comprobar la efectividad de las membranas sintetizadas a la hora de liberar la tetraciclina contenida en su estructura.

Para llevar a cabo este ensayo es necesario la preparación inicial del medio donde se va a realizar la liberación del fármaco. Este medio está formado por una disolución de DPBS y azida de sodio con una concentración del 0,05 M. La azida de sodio actúa un inhibidor del crecimiento bacteriano que evita el crecimiento de cualquier organismo que intente desarrollarse en la disolución. Por su parte, el DPBS se emplea para imitar la concentración de salina del medio fisiológico.

Una vez preparada esta disolución y mediante la ayuda de dos pinzas se traspasan los hidrogeles entrecruzados a 24 eppendours de 1,5 mL de capacidad total y se rellanan con 1 mL de la disolución. A partir de este instante comienza la liberación del fármaco en el medio. Para emular el interior del organismo humano se colocaron las muestras en un baño termoestabilizado con movimiento orbital para la agitación de las muestras programado a una temperatura de 37 °C imitando la temperatura estándar del cuerpo humano (figura 37).

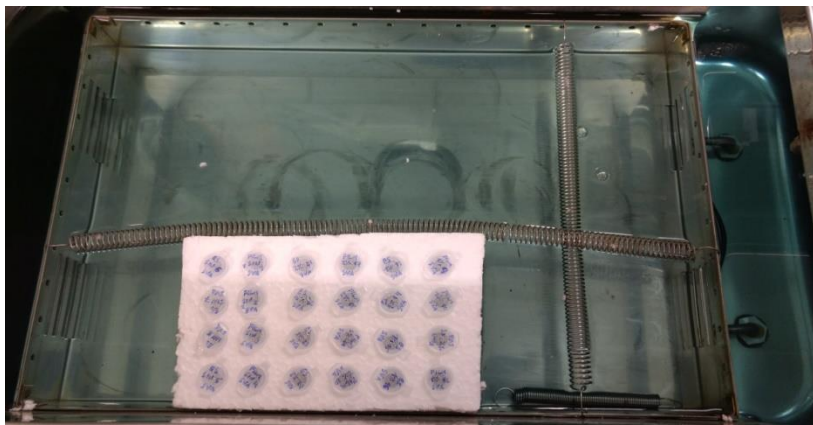


Figura 37. Imagen de las muestras de los hidrogeles colocadas en el baño termoestabilizado para el estudio de la liberación de la tetraciclina.

Para el estudio de la liberación del fármaco en el medio se toman 400 μL de líquido de cada muestra a las 3 horas, 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días y 5 días desde el comienzo de la liberación, renovando cada vez los 400 μL gastados de muestra con la disolución de azida de sodio y DPBS.

El análisis de las muestras obtenidas se realiza una vez concluido el tiempo establecido de cada liberación. Se realiza mediante espectrofotometría UV trabajando a una longitud de onda de 276 nm al ser esta longitud de onda la idónea para detectar la tetraciclina en la disolución.

Se ha de construir previamente a la lectura de las muestras, una recta de calibrado que represente la concentración conocida de tetraciclina frente a la absorbancia leída. La recta de calibrado realizada se realiza a partir de las mismas concentraciones empleadas en la recta de calibrado de la tiramina, estas concentraciones se observan en la tabla 5. Las rectas de calibrado se trazan para cada periodo de tiempo de estudio para minimizar así el error cometido en la lectura del espectrofotómetro. Con los datos de la recta de calibrado se lee la absorbancia de cada una de las muestras de estudio.

Relacionando la absorbancia obtenida con la concentración (en mg/ mL) de tetraciclina de la recta de calibrado a las primeras 3 horas se obtiene la concentración liberada de tetraciclina en este tiempo. Al trabajar con 1 mL por cada muestra la cantidad liberada (en mg) en estas 3 horas se corresponde con la concentración. De este modo se obtiene la cantidad liberada de tetraciclina por cada membrana al medio. Para minimizar el error cometido se normaliza este resultado dividiéndolo por el peso de la membrana anotado posteriormente como se indicaba en el apartado anterior, así se obtiene la cantidad liberada de tetraciclina por mg de muestra.

El cálculo de la liberación en las muestras tomadas en horario superior a las 3 horas es algo diferente debido a que al rellenar en cada lectura la muestra con los 400 μL de buffer para no agotar el medio de liberación hay que mantener los 600 μL restantes de las muestras y por lo tanto hay que tener en cuenta el efecto de dilución.

Mediante la espectrofotometría ya no se obtiene la concentración de tetraciclina liberada al medio en ese instante, si no que se puede obtener la concentración de tetraciclina en la muestra. Esta concentración total se compone por la masa liberada al cabo de ese tiempo más la masa contenida en los 600 μL mantenidos de la disolución anterior. Por ello mismo para calcular la masa de tetraciclina liberada (en todos los rangos de tiempo menos el inicial que fue de 3 horas y al ser el primero la lectura es directa) se ha de restar la masa total contenida en el eppendorf, es decir la concentración obtenida relacionando en la recta de calibrado multiplicada por 1 mL de disolución total, a la concentración obtenida en el horario anterior multiplicada por 0,6 mL para obtener la masa común en ambas mezclas. De esta forma se obtiene la masa liberada de tetraciclina en ese tiempo que se divide como anteriormente por el peso inicial de la membrana.

Se realizó este procedimiento para el resto de franjas horarias descritas anteriormente para conocer la cantidad de fármaco que ha sido liberada en cada momento del tiempo. Se efectuó también la acumulación de masa liberada sumando a cada vez la cantidad liberada del horario predecesor.

Una vez realizado el estudio de liberación de la tetraciclina se realizó el mismo procedimiento con las membranas de *electrospinning* y *solvent casting* de las muestras sintetizadas sin tetraciclina para el control del procedimiento experimental.

6.4.10 Ensayo de resistencia al desgarro

Se realizó el ensayo de resistencia al desgarro sobre las membranas de *electrospinning* tanto con emulsión como sin emulsión. Para comparar el efecto de la concentración del ácido hialurónico en las propiedades mecánicas, se variaron las concentraciones de ácido hialurónico empleadas en el recubrimiento del hidrogel, estudiando el efecto de la concentración al 0%, 1% y 2% de HA. Se utilizó una máquina de ensayos universal electromecánica Microtest, SCM 3000095 con un transductor de fuerza de 15 N.

En el procedimiento experimental del ensayo de desgarro se prepararon los hidrogeles modificados y reforzados con las membranas de *electrospinning* siguiendo el apartado 6.4.7 de síntesis de los constructos. En este caso los moldes del soporte se construyeron con una longitud de 22 mm por 9 mm. Para mantener un espesor de 1 mm se calculó el volumen requerido de hidrogel siendo de 198 μL .

Antes del inicio del proceso, tras la reticulación y el hinchado completo de los hidrogeles, se midieron las dimensiones (longitud, altura y espesor) de todas las muestras preparadas para minimizar el error cometido. Las muestras se perforaron en ambos extremos con una aguja quirúrgica realizando los agujeros en una posición central del constructo, de tal modo que traspasaran tanto al hidrogel como a la membrana. La distancia guardada desde los extremos del material hasta los agujeros fue de 5 mm, para obtener una distancia entre agujeros y entre mordazas del equipo de 12 mm.

Posteriormente se introdujeron en cada uno de los agujeros, dos hilos de cobre de 0,1 mm de diámetro (ya que su diámetro es el que más se aproxima al del hilo de sutura nylon 10/0 (~0.05 mm)) hasta la mitad de su longitud. Para fijar las muestras en el equipo, se pasaron los hilos por las poleas y se sujetaron mediante las mordazas tal y como se muestra en la figura 38. Como se observa en la

figura, se fijaron los hilos sin que estos ejercieran presión en la superficie de los hidrogeles ya que de lo contrario se estaría ejerciendo ya una fuerza inicial contribuyendo a la deformación de hidrogel.



Figura 38. Preparación inicial de las muestras para el ensayo de resistencia al desgarro en la máquina de ensayos Microtest.

Las condiciones experimentales empleadas en el ensayo de desgarro se detallan en la tabla 12

Tabla 12. Condiciones empleadas en el equipo para el ensayo de desgarro

Condiciones del ensayo	Valor
Fuerza máxima del equipo (N)	10
Velocidad de separación (mm/min)	5
Tiempo de adquisición de datos (ms)	2000
Distancia entre mordazas (mm)	12

Se realizó un programa de velocidad de deformación a modo tracción, a una velocidad de 5 mm/min, y se midió la máxima resistencia al desgarro hasta la rotura de la muestra, es decir, la fuerza mínima necesaria para desgarrar totalmente la muestra. En la figura 39 se observa una imagen de una muestra justo en el momento previo a su ruptura. Los resultados obtenidos fueron el promedio de cinco réplicas por tipo de membrana, y se expresan como el valor promedio con su respectiva desviación estándar (promedio \pm SD). A partir de estos datos, se obtiene una gráfica tensión-

deformación de cada muestra que muestra el comportamiento del material y permite la medición de su módulo elástico, su límite elástico y su tensión y deformación de ruptura.

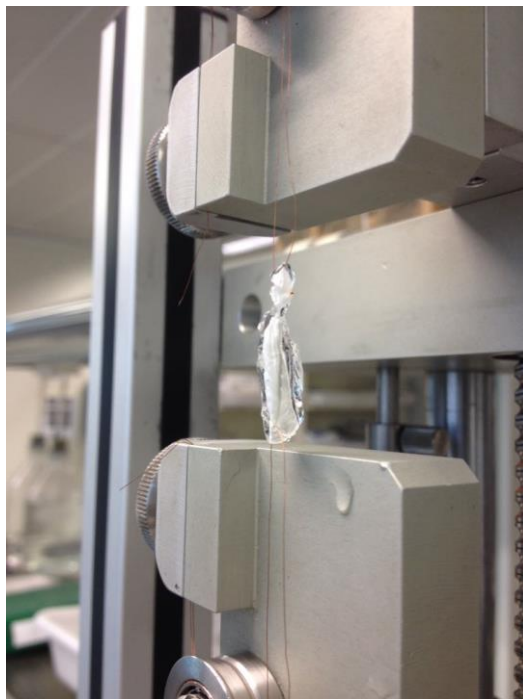


Figura 39. Imagen de una muestra al borde del desgarro.

6.5 ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se ha realizado con el software STATGRAPHICS Centurion. Se empleó el análisis de la varianza y pruebas de múltiples rangos con un p -value $< 0,05$ para determinar la significancia de las diferencias observadas en los resultados de los diferentes ensayos.

7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Descrito el procedimiento experimental, se evalúa en este apartado los diferentes resultados obtenidos.

7.1 MORFOLOGÍA DE LAS MEMBRANAS DE *ELECTROSPINNING* Y DE LOS FILMS DE *SOLVENT CASTING*

Las siguientes imágenes muestran una de las fotos tomadas mediante microscopía electrónica de barrido, tanto a 2000 aumentos (imágenes a la izquierda) como a 19 000 aumentos (imágenes a la derecha). La figura 40 se corresponde con las membranas de *electrospinning* sin emulsión, la figura 41 a estas membranas emulsionadas y la figura 42 a los films de *solvent casting* emulsionados.

Membranas *electrospinning* sin emulsión:

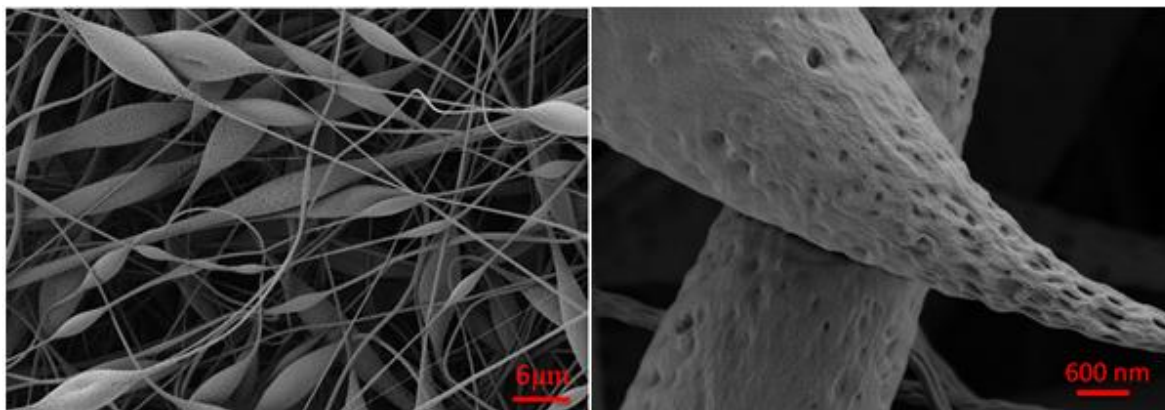


Figura 40. Imágenes de las membranas de *electrospinning* sin emulsión tomadas mediante microscopía electrónica de barrido a distintos aumentos.

Membranas *electrospinning* con emulsión:

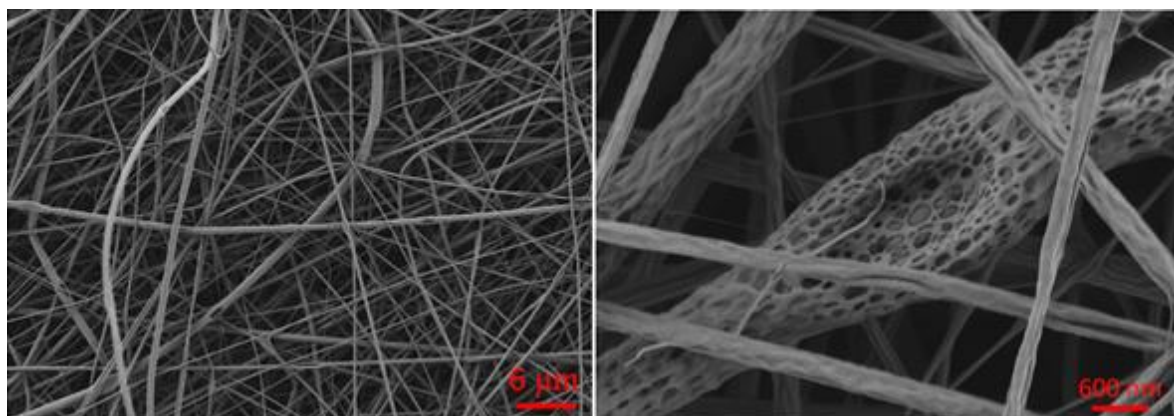


Figura 41. Imágenes de las membranas de *electrospinning* con emulsión tomadas mediante microscopía electrónica de barrido a distintos aumentos.

Films *solvent casting* con emulsión:

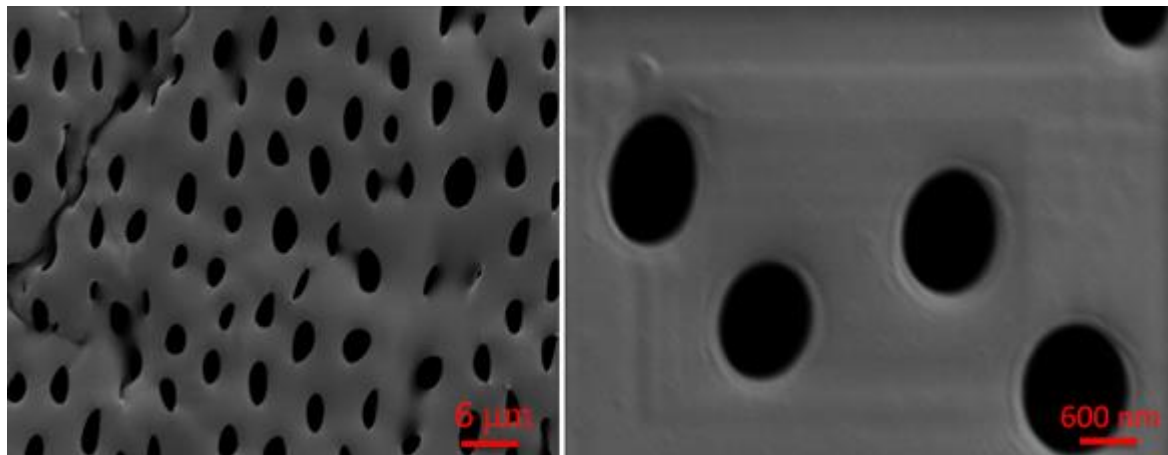


Figura 42. Imágenes de los films de *solvent casting* con emulsión tomadas mediante microscopía electrónica de barrido a distintos aumentos.

Observando las imágenes de la figura 40 se observa la formación de perlas a lo largo de las fibras y una distribución no homogénea respecto al diámetro de cada fibra. Se busca que las fibras realizadas estén caracterizadas por una distribución de tamaño lo más estrecha y homogénea posible.

En la figura 41, se observa que las fibras poseen un tamaño más homogéneo y no hay formación de perlas en las fibras, de esta forma se favorece una cinética de liberación de fármaco proporcional y constante en las membranas. Se comprueba también que las condiciones a las que se ha llevado a cabo el *electrospinning* con la emulsión han sido seleccionadas correctamente ya que estas condiciones son las óptimas para llevar a cabo el proceso de emulsión a las condiciones especificadas.

Por otro lado, en las imágenes de las fibras con emulsión se identifican mayor densidad de poro en las fibras en comparación con las imágenes de las fibras de PLLA puro. Esto se debe al efecto de la emulsión, la inclusión de la fase acuosa con el fármaco contribuye al incremento del área de los poros.

En la figura 42 se observa la morfología de las membranas de *solvent casting* con emulsión. Se observa los poros formados en la emulsión en estas membranas destacando que el diámetro de poro de estas muestras es mayor que en el de las membranas de *electrospinning* y hay mayor cantidad de poros.

En los histogramas de las figuras 43 y 44 se compara la frecuencia de los distintos diámetros de fibra tanto, las preparadas sin emulsión como las emulsionadas.

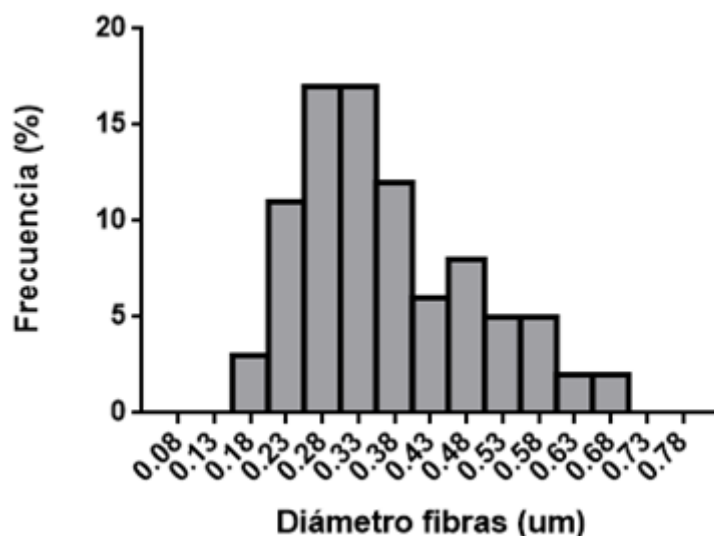


Figura 43. Histograma de la distribución de los diámetros de fibras de las membranas de electrospinning sin emulsionar.

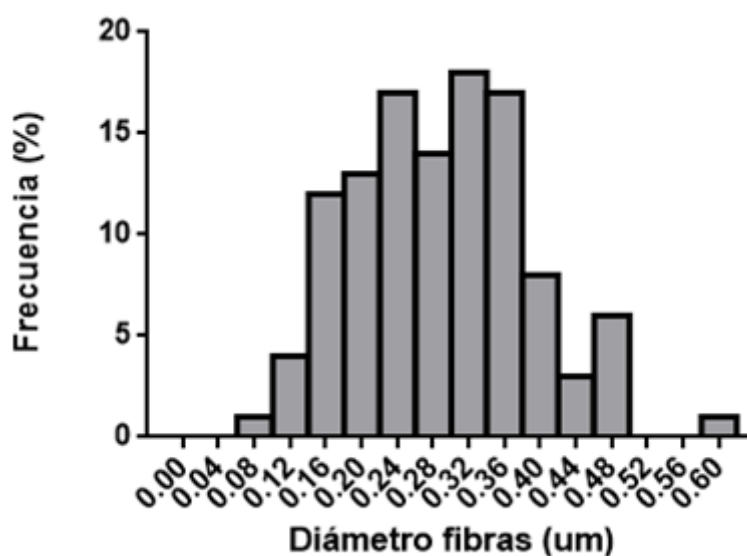


Figura 44. Histograma de la distribución de los diámetros de fibras de las membranas de electrospinning con emulsión.

Comparando ambas figuras se concluye que los diámetros de las fibras realizadas a partir de la emulsión siguen una distribución homogénea. Se observa que los datos analizados siguen una estructura en forma de campana de Gauss, donde la mayoría de los diámetros miden entre 0,24 y 0,36 μm . En cambio, el histograma de los diámetros medidos en las muestras sin emulsionar presenta asimetría positiva, debido a la mayor variedad de distribución de los diámetros de sus

fibras. Por lo tanto, su rango de diámetros de fibra repetidos con mayor frecuencia es más reducido, pudiéndolo únicamente acotarlo entre 0,28 y 0,33.

La figura 45 representa el diagrama caja y bigotes de ambas poblaciones. En este diagrama se puede observar de nuevo cómo la distribución de diámetros de fibras en las membranas sin emulsión presenta asimetría positiva. La media está muy desplazada hacia la derecha debido a la gran cantidad de fibras de gran grosor de las membranas. Además, se observa que posee un elevado número de datos anómalos debidos posiblemente a la medición de las zonas con perlas o a las fibras más gruesas de dichas fibras. Por su parte, en el diagrama caja bigotes de las membranas con emulsión se confirma que la distribución es homogénea. Se puede observar cómo la media coincide considerablemente con la mediana y que la mayoría de las mediciones de los diámetros se encuentran dentro del intervalo intercuartílico, lo que demuestra definitivamente que la morfología de los diámetros de las fibras obtenidas a partir de la emulsión es válida. Estos resultados son compatibles con los obtenidos en el Trabajo Final de Grado [41].

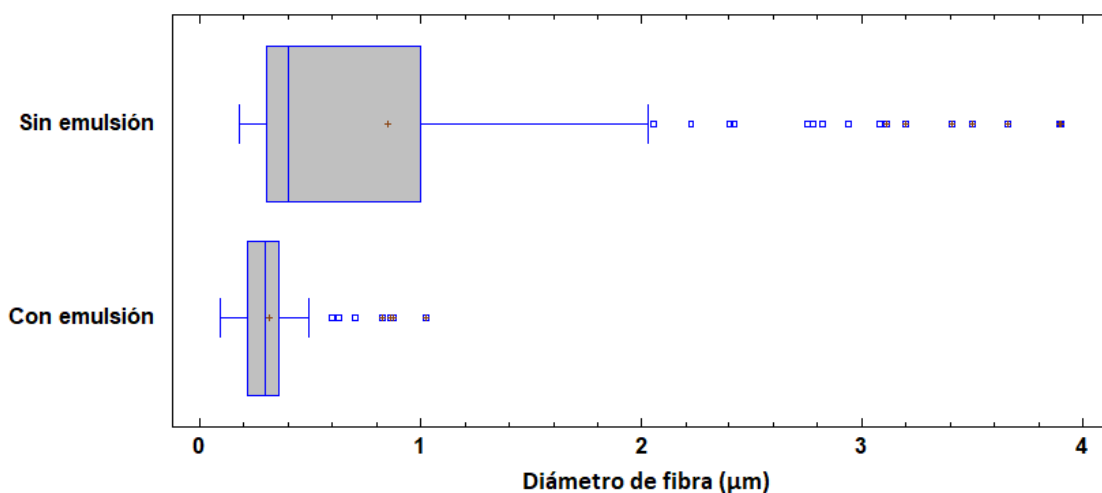


Figura 45. Diagrama de caja y bigotes de los diámetros de las fibras de las membranas de *electrospinning* con emulsión y sin emulsión

7.2 GRADO DE SUSTITUCIÓN DE LA TIRAMINA EN EL ÁCIDO HIALURÓNICO.

Una vez realizada la síntesis de ácido hialurónico modificado con tiramina se determinó el grado de injerto de la tiramina en las cadenas de ácido hialurónico para comprobar si ha sido injertado y en qué cantidad.

El grado de sustitución está muy relacionado con el tiempo de gelificación del hidrogel puesto que a mayor grado de sustitución mayor cantidad de tiramina estará presente en el hidrogel y por ello el tiempo de gelificación es menor. Es por ello que es muy importante determinar este grado de sustitución, no sólo para comprobar si se ha injertado tiramina en el ácido hialurónico, sino para ajustar el tiempo de gelificación en la formación del hidrogel.

La figura 46 muestra los resultados obtenidos en los 3 lotes sintetizados de la concentración final obtenida de tiramina en HA, así como la media y la desviación estándar de ambos. Por su parte, la figura 47 muestra el porcentaje de esta sustitución respecto al HA en estos 3 lotes.

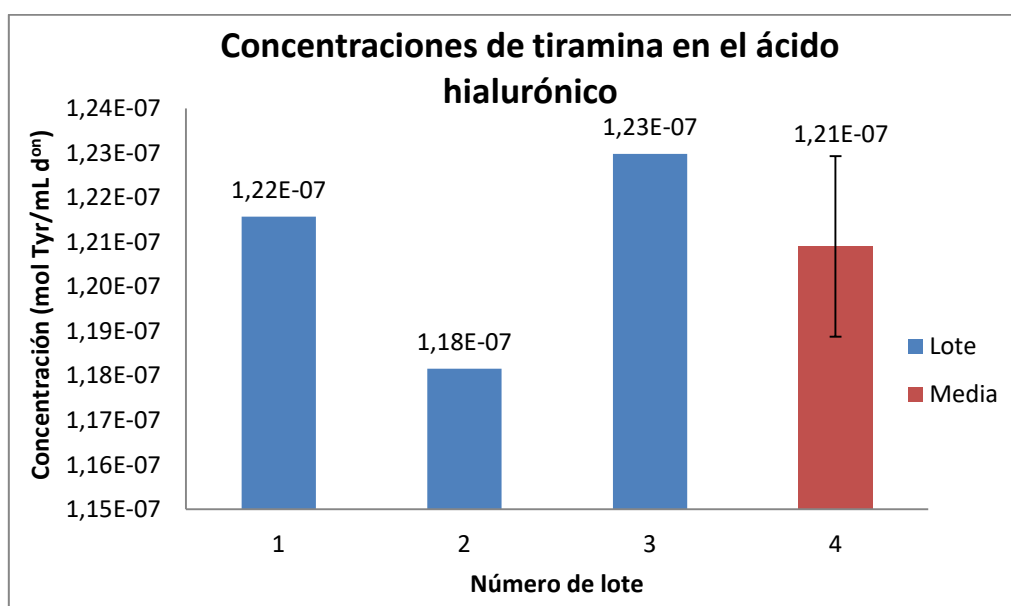


Figura 46. Concentraciones obtenidas de tiramina en el ácido hialurónico.

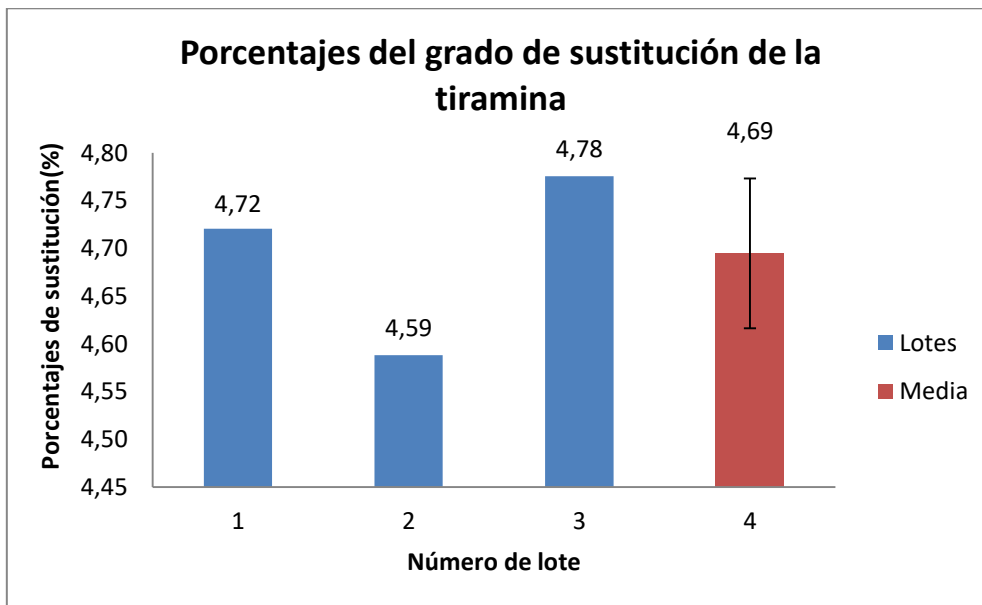


Figura 47. Porcentajes de sustitución obtenidos de la tiramina en el ácido hialurónico.

Se observa de ambas gráficas que los resultados obtenidos en cada uno de los lotes son similares, obteniendo como media una sustitución de $1,21 \cdot 10^{-7}$ mol de Tyr/ mg de HA que corresponde a un porcentaje de sustitución del 4,7%. Este grado de sustitución obtenido es equiparable al obtenido en el trabajo de *Darr et al.* donde se obtuvo un porcentaje de sustitución de tiramina del 4,7% [42].

En el ANEXO II se adjunta el procedimiento seguido para la realización de las rectas de calibrado y la obtención de las concentraciones.

7.3 CARACTERIZACIÓN DE LA GELIFICACIÓN MEDIANTE REOMETRÍA.

Para la determinación del tiempo de gelificación se estudió la variación del módulo de almacenamiento (G') respecto al tiempo. Para el cálculo de este tiempo se unieron mediante rectas los dos cambios de pendiente de las gráficas en cuestión. La intersección de estas rectas determinó el tiempo de gelificación ya que es el tiempo en el cual el módulo de almacenamiento cambia bruscamente y se va estabilizando debido a que se ha alcanzado el máximo grado de reticulación y la gelificación completa del hidrogel. En esta figura 48 se muestra un ejemplo del cálculo del tiempo de gelificación para la muestra 1 del hidrogel sintetizado al 1% de HA. El cálculo de los demás tiempos se realizó de la misma manera.

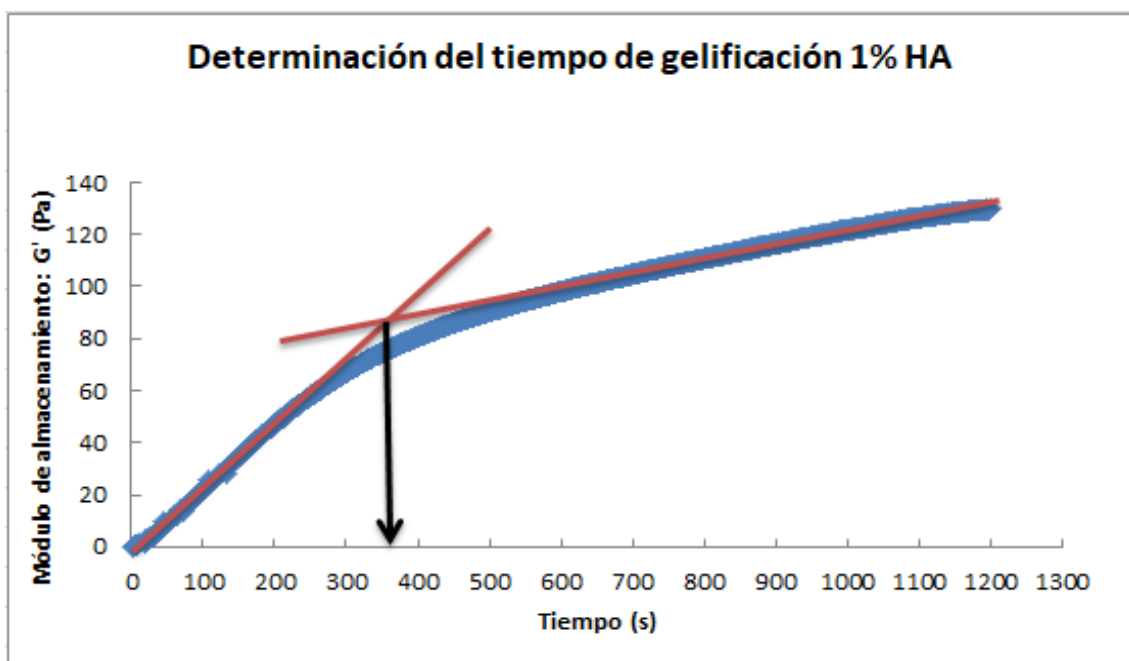


Figura 48. Representación del módulo elástico frente al tiempo para la muestra del hidrogel al 1% de ácido hialurónico para la determinación de su tiempo de gelificación

Se observa en la figura que el tiempo de gelificación de la muestra es de 390 segundos que equivalen a 6 minutos y 30 segundos.

Calculando el tiempo de gelificación de las muestras al 1% y 2% de HA y calculando sus medias y desviaciones estándar se obtuvo la siguiente figura 49. En esta gráfica se comparan ambos tiempos de gelificación.

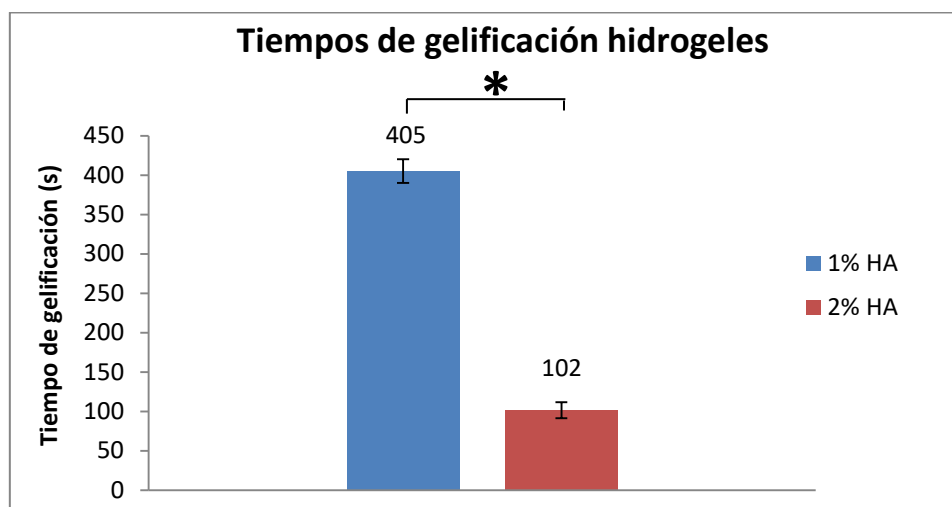


Figura 49. Obtención de los tiempos de gelificación en el entrecruzamiento de los hidrogeles al 1% y al 2% de ácido hialurónico

En el presente gráfico se observa que el tiempo medio de gelificación para los hidrogeles de concentración de 1% de HA fue de 405 segundos, sumándole además 20 segundos consumidos entre la incorporación del sustrato y el comienzo de la lectura este tiempo es de 425 segundos (7 minutos y 5 segundos). Para los hidrogeles al 2% de HA este tiempo fue de 102 segundos que con la adición de estos mismos 20 segundos hace un total de 122 segundos (2 minutos y 2 segundos). Por lo tanto, el tiempo de gelificación de los hidrogeles al 1% es aproximadamente cuatro veces mayor. Los hidrogeles al 2% entrecruzan antes debido a su mayor proporción de tiramina en las cadenas para en entrecruzamiento, al tener mayor porcentaje de tiramina la reacción de entrecruzamiento esta facilitada. Por ello, a pesar de que los hidrogeles al 2% de concentración de ácido hialurónico eran más viscosos, lo que suponía una peor difusión del peróxido de hidrógeno para el entrecruzamiento, la mayor concentración de ácido hialurónico suponía un entrecruzamiento más rápido del hidrogel.

En la siguiente gráfica 50 se estudió el efecto del módulo de almacenamiento frente a variaciones en la tensión de oscilación. Para ello se representó el módulo de almacenamiento frente a variaciones del porcentaje de oscilación para determinar si el grado de oscilación afecta en modo alguno al módulo obtenido. Se representó un ejemplo muestras tanto al 1% de HA como al 2% de HA para su comparación.

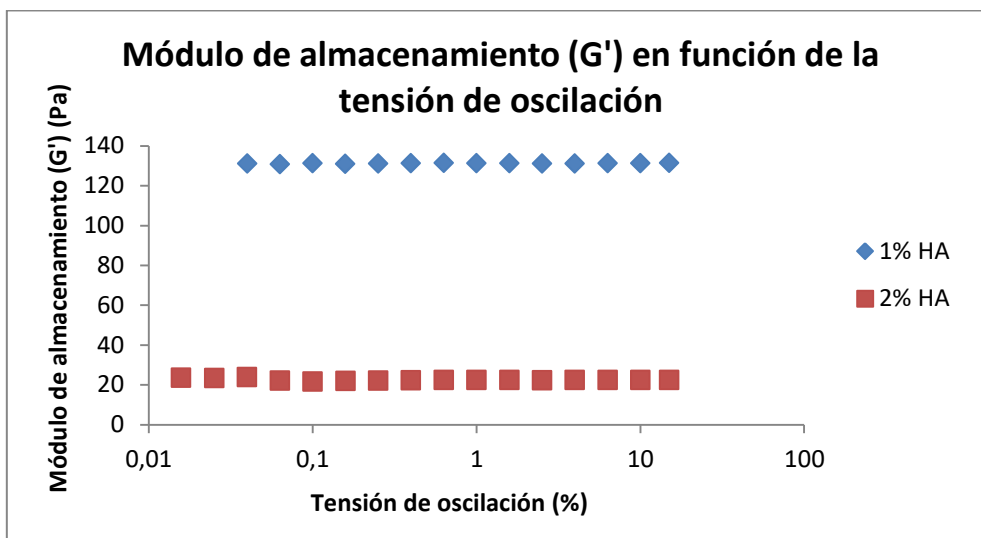


Figura 50. Variación del módulo de almacenamiento en función de la tensión de oscilación con concentraciones de 1% y 2% de ácido hialurónico

Se observa que el módulo de almacenamiento se mantiene constante para ambas concentraciones de ácido hialurónico, por ello la tensión de oscilación aplicada no afecta al módulo de almacenamiento obtenido. En la comparación de ambas representaciones se observa que el módulo de almacenamiento es mayor en los hidrogeles al 1% de HA que en los hidrogeles al 2% de HA, lo que resulta extraño, ya que los hidrogeles más concentrados suelen tener mayor módulo mecánico a cizalla. Esto es debido a que la mayor viscosidad del HA al 2% impidió la difusión de reactivos en la muestra al gelificar, y los hidrogeles al 2% quedaron gelificados sólo en su superficie, quedando el interior en forma líquida.

En la gráfica 51 se representa en mismo gráfico pero con la pérdida de módulo (G'') para observar si la tensión oscilatoria provoca variaciones en el módulo.

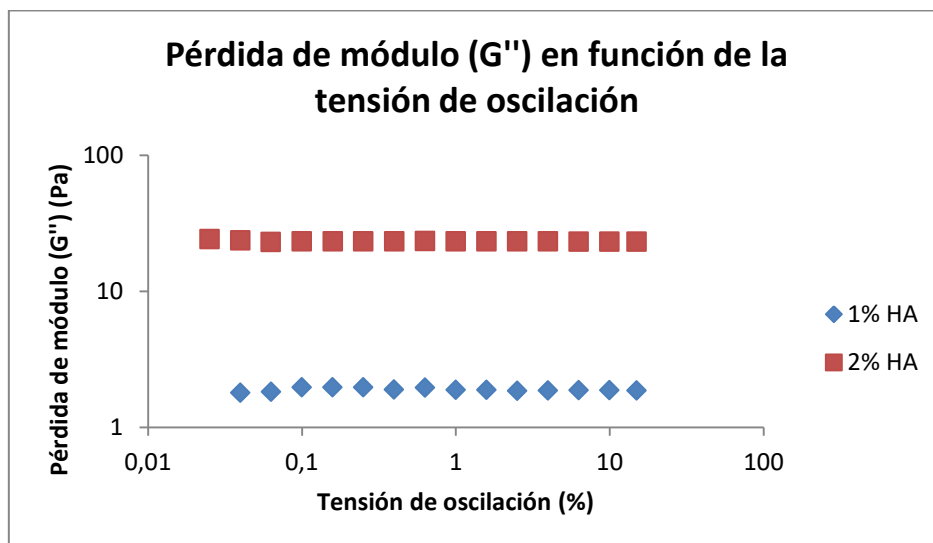


Figura 51. Variación de la pérdida de módulo en función de la tensión de oscilación con concentraciones de 1% y 2% de ácido hialurónico

Se observa en la gráfica que la pérdida de módulo es mayor para los hidrogeles al 2% de HA que al 1% de HA.

Se realizó el mismo estudio, pero con variaciones en la frecuencia de oscilación. De esta forma, se determina también si la frecuencia en la oscilación del equipo de lectura afecta a la lectura del módulo de almacenamiento y a la pérdida de módulo. Para ello se representan las gráficas 52 y 53 donde se representan el módulo de almacenamiento bajo variaciones en la frecuencia en la primera gráfica y la pérdida de módulo en función de la frecuencia.

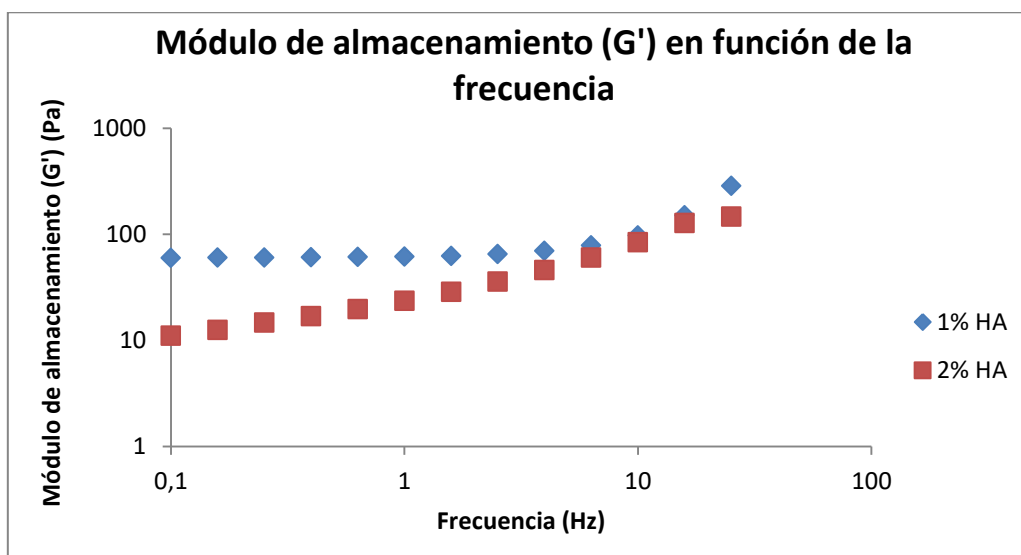


Figura 52. Variación del módulo de almacenamiento en función de la frecuencia con concentraciones de 1% y 2% de ácido hialurónico

En esta primera gráfica se observa que para las variaciones de frecuencia el módulo de almacenamiento varía más que al estar sometido a variaciones en la tensión de oscilación. A pesar de ello el módulo de almacenamiento se mantiene considerablemente constante hasta llegar a una frecuencia de 2,5 Hz donde el valor del módulo comienza a irse de rango. Por esta razón se eligió una frecuencia de 1Hz para la determinación del tiempo de gelificación. De forma general los hidrogeles al 1% de HA tuvieron mayor módulo de almacenamiento que los hidrogeles al 2% de HA (debido a la mala difusión de reactivos en el hidrogel al 2%). Además, los valores del módulo obtenidos son similares a los anteriores.

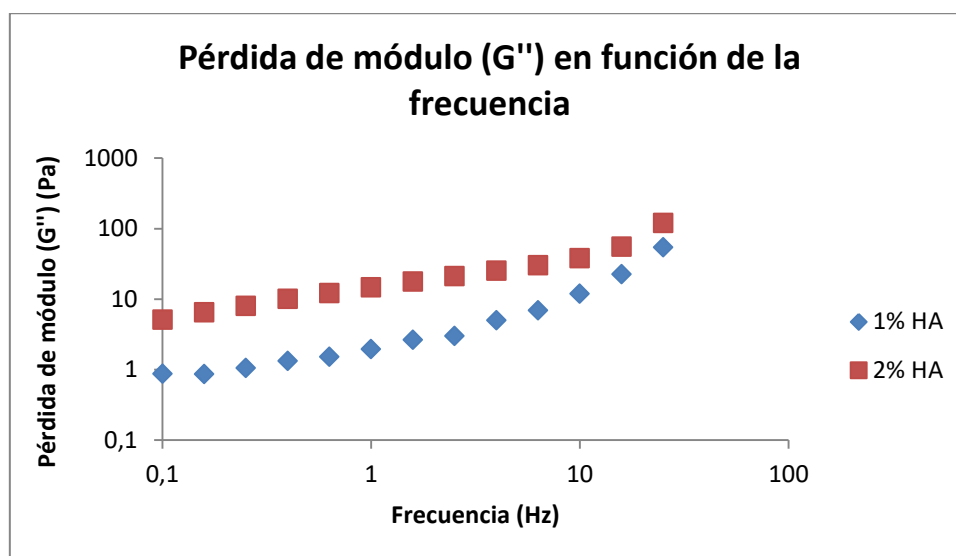


Figura 53. Variación de la pérdida de módulo en función de la frecuencia con concentraciones de 1% y 2% de ácido hialurónico

En esta gráfica se observa la variación en la pérdida de módulo bajo variaciones en la frecuencia. Los resultados que se obtienen son similares a los obtenidos en la variación de la tensión de oscilación. Los hidrogeles al 2% de HA fueron superiores a los del 1% de HA y se obtuvieron valores muy similares a los anteriores. Además, como pasaba con el módulo de almacenamiento, la pérdida de módulo se mantiene más o menos constante ante variaciones en la frecuencia hasta llegar a una frecuencia de 2,5 Hz.

Para una comparación más determinante de los módulos de almacenamiento y la pérdida de módulo obtenida se representan en los siguientes gráficos de las figuras 54 y 55 las medias y desviaciones de las muestras analizadas. De este modo se compara los valores obtenidos de ambos módulos para las diferentes concentraciones.

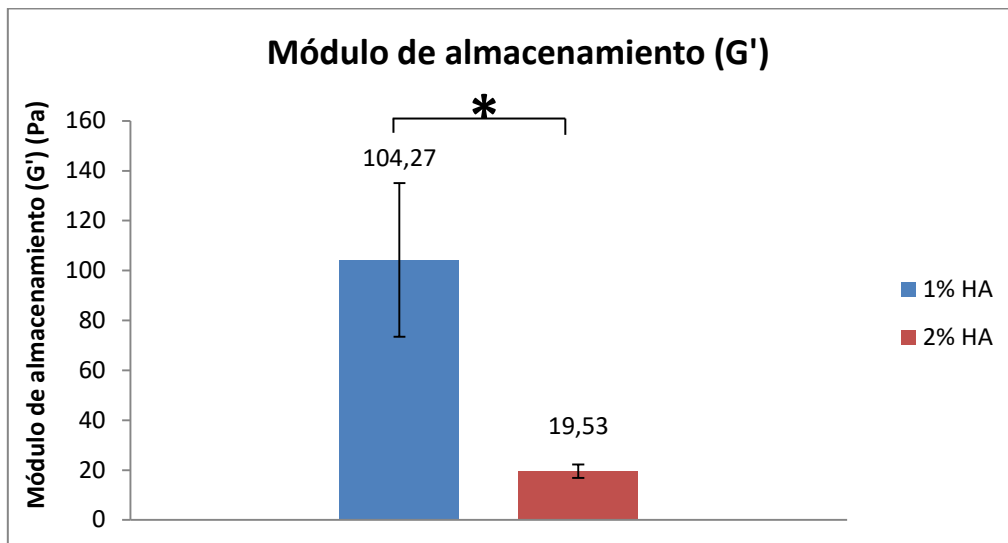


Figura 54. Módulo de almacenamiento obtenido en los hidrogeles para las concentraciones al 1% y 2% de ácido hialurónico con la frecuencia de 1Hz y una deformación al 1%

En este primer gráfico se compararon los valores del módulo de almacenamiento para las diferentes concentraciones de ácido hialurónico. Se concluye que el valor de este módulo es mucho mayor para los hidrogeles al 1% que al 2% de HA siendo de 104,27 Pa y de 19,53 Pa respectivamente.

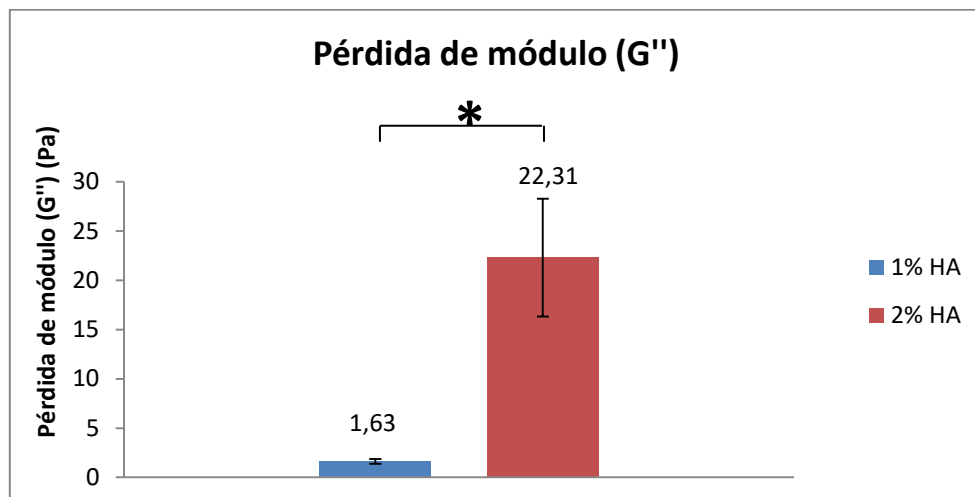


Figura 55. Pérdida de módulo obtenido en los hidrogeles para las concentraciones al 1% y 2% de ácido hialurónico con la frecuencia de 1Hz y una deformación al 1%

Este gráfico presenta los resultados de la pérdida de módulo para las diferentes concentraciones estudiadas de ácido hialurónico. Se observa en este caso que los hidrogeles al 2% presentan mayor pérdida de módulo (22,31 Pa) que los hidrogeles entrecruzados al 1% (1,63 Pa).

7.4 ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

En el estudio de la liberación de la tetraciclina se empleó la espectrofometría para determinar la concentración liberada a diferentes días. De esta forma se calculó la liberación acumulada en función del tiempo para representar las gráficas de la concentración liberada. Las variables de las gráficas son, por un lado, las diferentes concentraciones de HA empleadas para el recubrimiento, y por otro lado, el soporte de liberación empleado, ya sea las membranas de *electrospinning* o los films. A partir de las gráficas, se determinó la liberación máxima de cada membrana y de cada film según la concentración de HA. Se determinó también el tiempo de liberación de la totalidad de la tetraciclina. De este modo, se comparó la influencia de la concentración de ácido hialurónico empleado en el entrecruzamiento del hidrogel (0%, 1% y 2%) con su capacidad de liberación, tanto de las membranas como de los films de *solvent casting*. Por otro lado, se comparó también la diferencia y la influencia en la liberación de las membranas de *electrospinning* respecto a los films de *solvent casting* para cada una de las concentraciones estudiadas.

Los gráficos de las imágenes 56 y 57 muestran la liberación acumulada de las membranas de *electrospinning* y de los films de *solvent casting* respectivamente. En ambos gráficos se estudió la influencia de la concentración del ácido hialurónico en la liberación de la tetraciclina y la duración de la liberación hasta su máximo rendimiento.

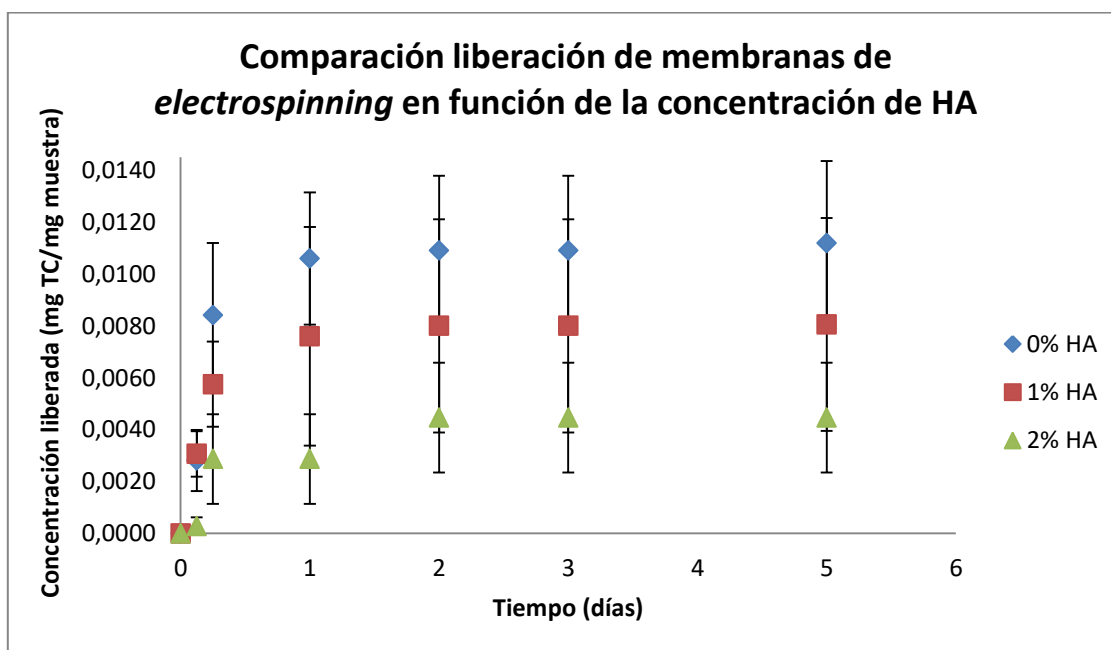


Figura 56. Liberación acumulada de tetraciclina de las membranas de *electrospinning* para concentraciones de 0%, 1% y 2% de HA empleado en el entrecruzamiento del hidrogel.

En esta gráfica se observa que la liberación máxima de las tres concentraciones se alcanzan aproximadamente una vez transcurrido un día desde el comienzo del estudio. Se concluye de esta forma que la concentración de ácido hialurónico no afecta al tiempo de liberación del fármaco

cuando se emplean las membranas de *electrospinning*, es decir que la cantidad máxima de liberación de las membranas de *electrospinning* se libera al día del inicio de su liberación, independientemente de la concentración de ácido hialurónico.

Respecto a la cantidad de tetraciclina que se libera se observa que la concentración más efectiva o que más tetraciclina a liberado es la membrana al 0% de HA, siendo su máxima liberación de 0,0112 mg de tetraciclina/mg de muestra. La concentración de 1% ha liberado como concentración máxima 0,0081 mg de tetraciclina/mg de muestra siendo esta concentración la siguiente que más capacidad de liberación tiene. Por último, la concentración de menor liberación máxima ha sido la membrana de 2% de HA habiendo liberado prácticamente 3 veces menos cantidad de tetraciclina por mg de muestra que la de 0% de concentración de HA. Estos resultados son los esperados ya que a mayor concentración de HA mayor barrera de difusión que impide la difusión de tetraciclina al medio. Por lo tanto, para las membranas de *electrospinning*, a mayor concentración de ácido hialurónico que recubre la membrana menor es la capacidad de liberación de la tetraciclina. La membrana sin hidrogel es la que más tetraciclina libera ya que no posee el impedimento difusivo que aporta la inclusión del hidrogel.

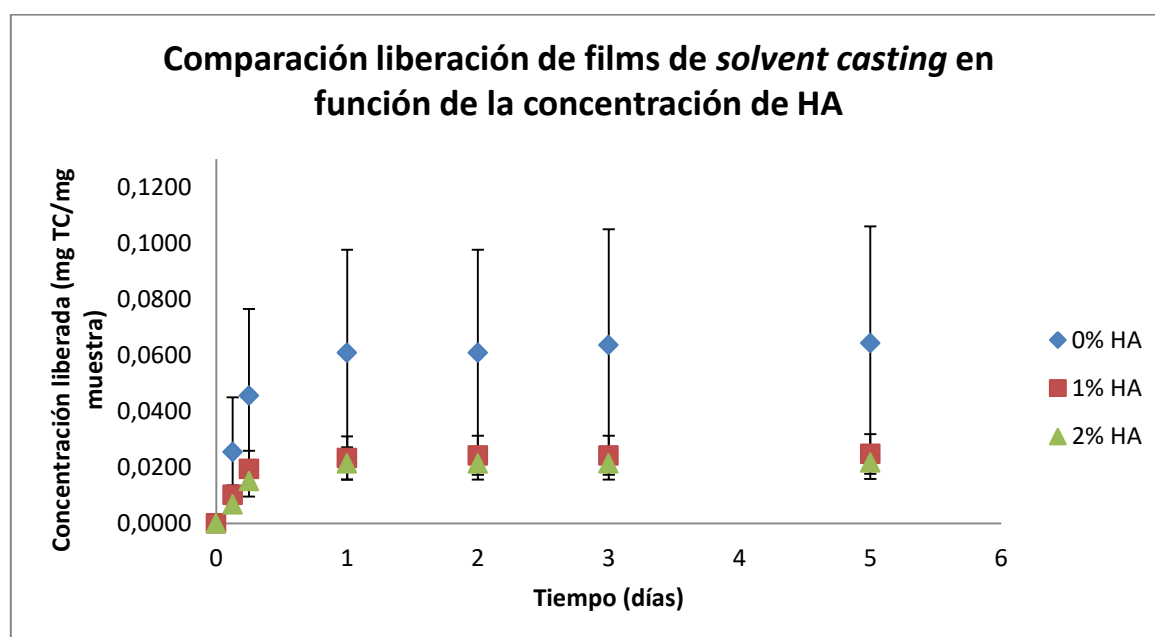


Figura 57. Liberación acumulada de tetraciclina de los films de *solvent casting* para concentraciones de 0%, 1% y 2% de HA empleado en el entrecruzamiento del hidrogel.

En cambio en la figura 57 se muestra la liberación a partir de los films de *solvent casting* para las diferentes concentraciones. Lo primero que se observa es que en estas muestras los films del 0% de HA son los que más tetraciclina han liberado, este resultado es equivalente al obtenido en las membranas de *electrospinning* para la misma concentración de ácido hialurónico y era de esperar ya que los films en cuestión no están entrecruzados mediante el hidrogel y por ello no poseen barrera difusiva para el medicamento. La concentración máxima liberada para esta concentración en los films

de *solvent casting* fue de 0,0644 mg de tetraciclina por mg de muestra y su tiempo de liberación es de 1 día. En cambio, para las concentraciones del 1% y del 2%, se observa que los puntos se solapan entre ellos dificultando su análisis. Esto se debe a la diferencia de escala que hay entre la liberación entre los films de 0% y los films de estas concentraciones. Por ello, para poder compararlos entre ellos, se representa en la figura 58 un gráfico con las concentraciones de 1% y 2%.

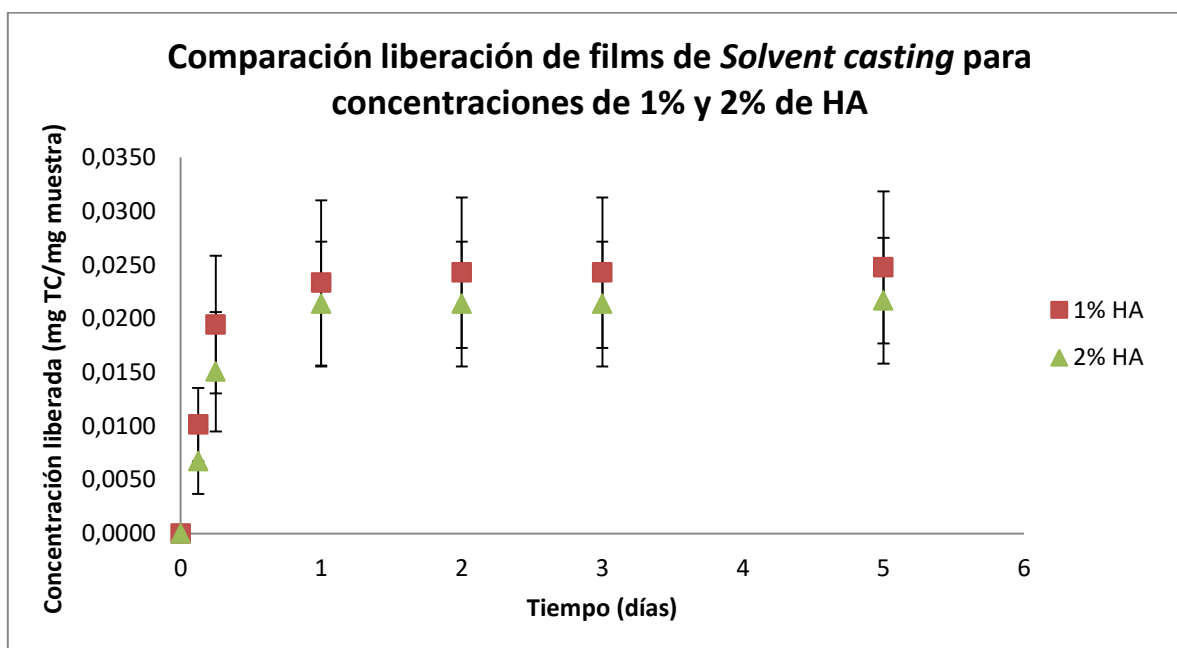


Figura 58. Liberación acumulada de tetraciclina de los films de *solvent casting* para concentraciones de 1% y 2% de HA empleado en el entrecruzamiento del hidrogel.

Se observa en esta gráfica que para los films de *solvent casting* la liberación final es ligeramente mayor para los films al 1% que para los films al 2%. Para ambas muestras, la liberación máxima alcanzada fue de 0,0248 para el 1% y de 0,0217 para para el 2%. Por lo tanto, para las membranas y para los films, la concentración de 2% de HA ejerce mejor su función de barrera difusiva en comparación con la concentración del 1% que tiene menor concentración de ácido hialurónico. A pesar de esto, la liberación de tetraciclina es similar para ambos recubrimientos. Los films de *solvent casting* tienen mayor capacidad de retención de tetraciclina que las membranas de *electrospinning* debido a que los primeros no se fabrican mediante el proceso de *electrospinning* que provoca mucha pérdida de tetraciclina en la deposición del electrohilado. Debido a esta gran cantidad de tetraciclina introducida en los films, las barreras de hidrogel de 1% y de 2% son capaces de retener la misma cantidad de tetraciclina y por ello se obtienen resultados parecidos. Para observar mayores diferencias en la liberación habría que probar con una mayor diferencia de concentración es de ácido hialurónico para comprobar si de este modo se retiene más cantidad de tetraciclina.

Respecto al tiempo de liberación, la gráfica muestra que se trata un día para la completa liberación. Por lo tanto, el tiempo de liberación es el mismo para los films de *solvent casting*,

independientemente de la concentración de HA empleada. El tiempo de liberación máxima de tetraciclina tanto en los films de *solvent casting* y las membranas de *electrospinning* es siempre de un día independientemente de la concentración de hidrogel empleada como recubrimiento.

Finalmente, se estudió como afecta en la liberación el empleo de las membranas de *electrospinning* respecto a los films de *solvent casting* para las mismas concentraciones de HA. De esta forma se observó la diferencia que existe en la liberación de tetraciclina entre membranas y films y si la variación de la concentración afecta de algún modo a esta diferencia. Para ello, se representan las gráficas en las figuras 59, 60 y 61.

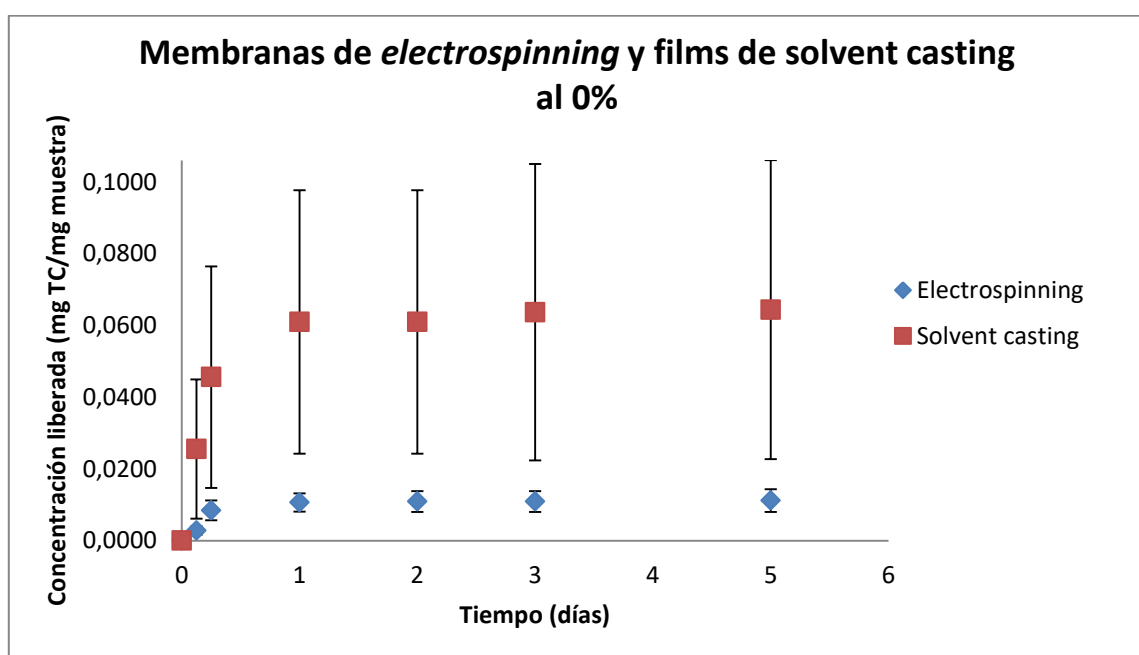


Figura 59. Liberación de tetraciclina de membranas de *electrospinning* y de films de *solvent casting* con una concentración de 0% de HA.

En esta primera gráfica, se observa que la liberación aportada por el film de *solvent casting* es mucho mayor que la liberación de la membrana de *electrospinning*. A pesar de que las concentraciones de ácido hialurónico al 0% son las que más capacidad de liberación tienen, la diferencia entre ambas liberaciones es considerablemente elevada. El film al 0% fue el que más tetraciclina liberó de todas las variaciones estudiadas (0,0644 mg de tetraciclina por mg de muestra). Este resultado coincide con lo esperado ya que este constructo no posee hidrogel como recubrimiento y los films captaron más tetraciclina inicialmente que las membranas debido al proceso por el cual se fabricó cada una.

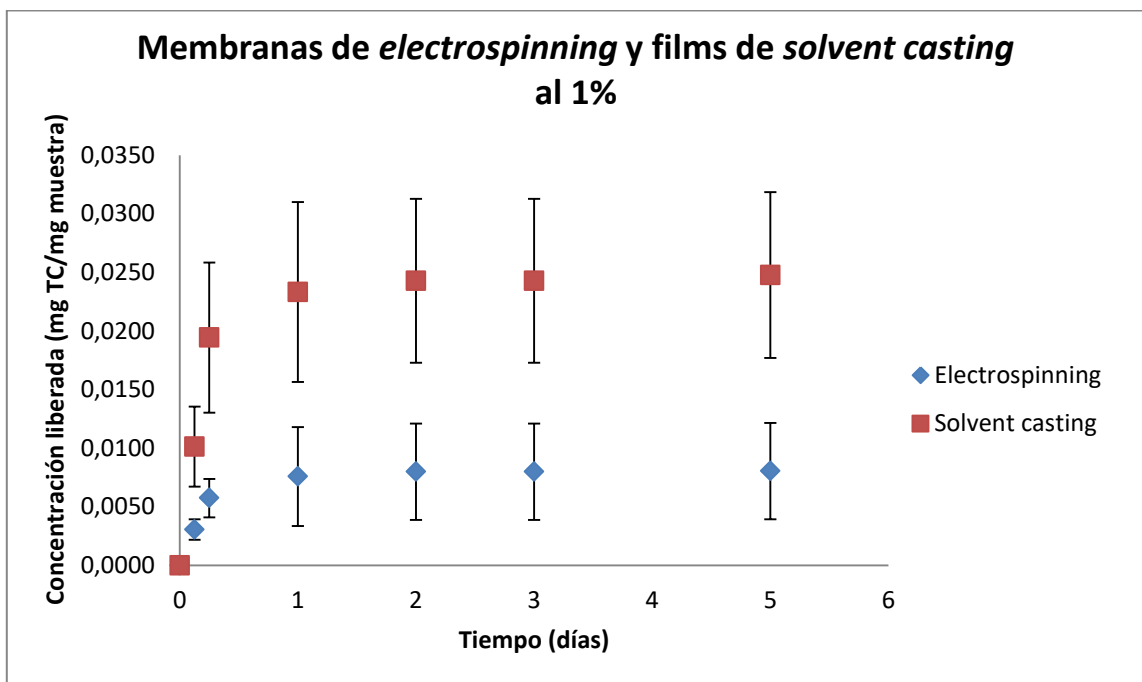


Figura 60. Liberación de tetraciclina de membranas de *electrospinning* y de films de *solvent casting* con una concentración de 1% de HA.

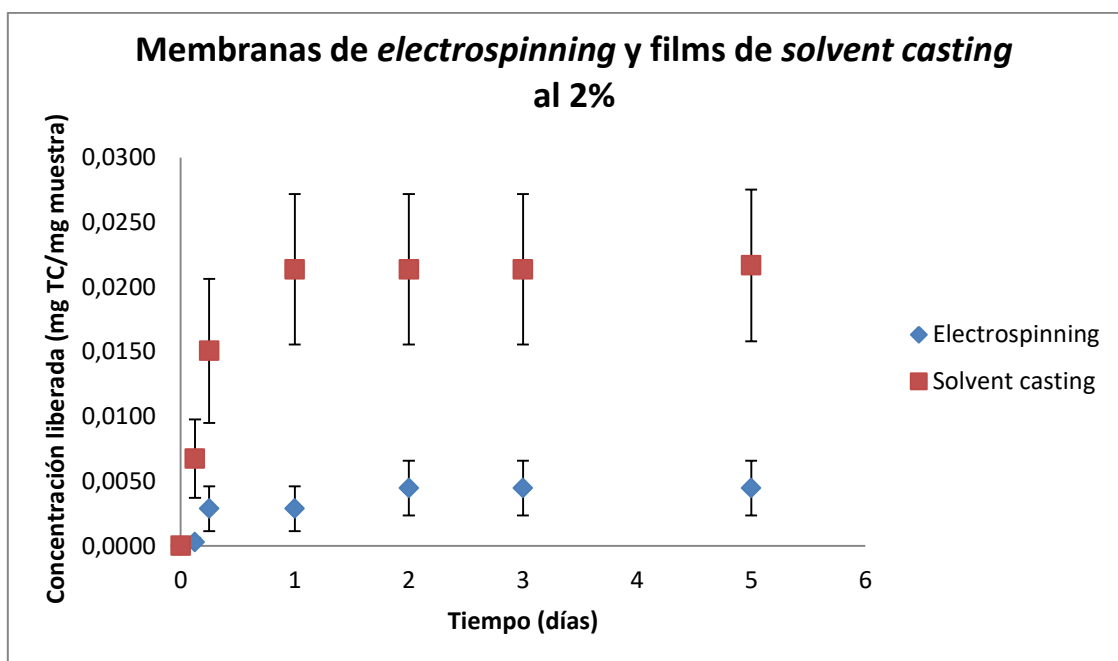


Figura 61. Liberación de tetraciclina de membranas de *electrospinning* y de films de *solvent casting* con una concentración de 2% de HA.

Analizando en conjunto estas tres últimas gráficas, se destaca que los films de *solvent casting* liberan más tetraciclina que las membranas de *electrospinning* en cada una de las distintas concentraciones de HA, observándose una elevada diferencia en la concentración del 0%. Esto se debe a que los films contienen más tetraciclina en su estructura que las membranas ya que estas últimas pierden gran cantidad de su tetraciclina durante el proceso de *electrospinning* debido a la degradación de la tetraciclina por el alto voltaje y a la formación del multiyet. Respecto al tiempo de liberación, las gráficas muestran que el tiempo de liberación de la tetraciclina no depende del tipo de membrana empleada, ya que para las membranas como para los films este tiempo es de un día en cada una de las concentraciones estudiadas.

Finalmente, en base a las membranas de *electrospinning*, para el estudio concreto de la liberación controlada de tetraciclina a partir de las membranas electrohiladas, se realizó el siguiente gráfico de la figura 62 donde se muestra la cantidad máxima de tetraciclina liberada por las membranas en función de su concentración. Se realiza así un estudio sobre las diferencias significativas existentes entre estas diferentes membranas en relación con la cantidad máxima de tetraciclina que son capaces de liberar.

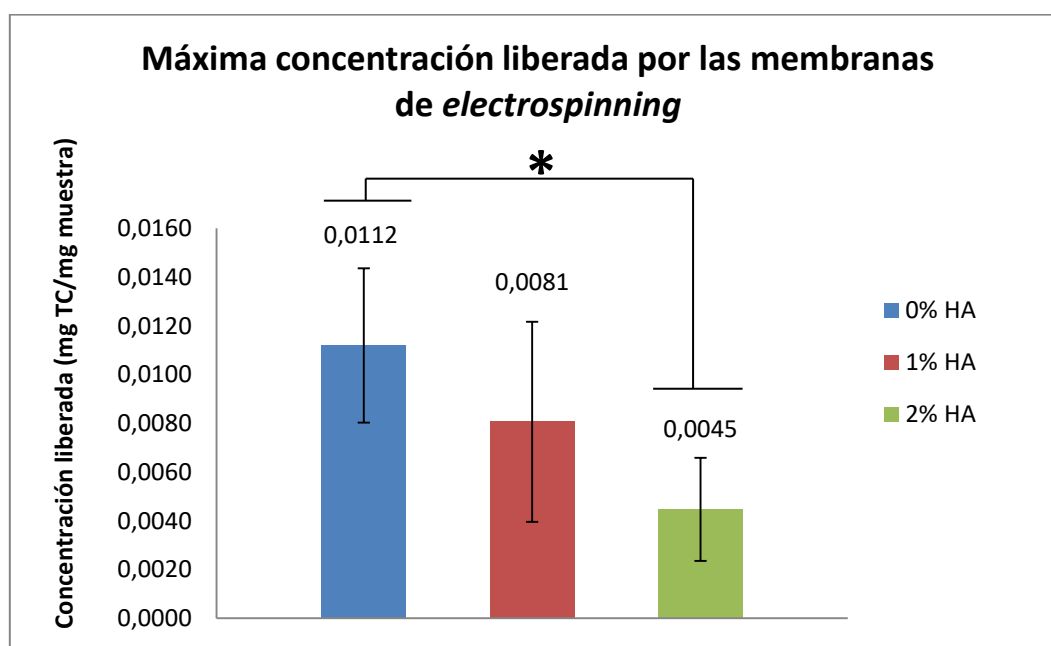


Figura 62. Comparación de la concentración máxima liberada por las membranas de *electrospinning* para las concentraciones de 0% 1% y 2% de HA.

En el gráfico se comprueba que existen diferencias significativas en la liberación de fármaco entre las membranas de 0% y de 2% de HA para las membranas de *electrospinning*. En cambio, no existen diferencias significativas entre las membranas al 0% y al 1%. Esto significa que las membranas de *electrospinning* al 0% son capaces de liberar más tetraciclina que las otras dos concentraciones.

Por último, se resumen en la tabla 13 los datos de la liberación máxima calculada para cada tipo de membrana y para cada concentración de ácido hialurónico.

Tabla 13. Concentraciones máximas de tetraciclina liberada por cada tipo de constructo

MÁXIMA CONCENTRACIÓN LIBERADA (mg de tetraciclina/mg de muestra)					
Film <i>solvent casting</i> 0% HA	Membrana <i>electrospinning</i> 0% HA	Film <i>solvent casting</i> 1% HA	Membrana <i>electrospinning</i> 1% HA	Film <i>solvent casting</i> 2% HA	Membrana <i>electrospinning</i> 2% HA
0,0644	0,0112	0,0217	0,0081	0,0248	0,0045

Para la visualización más concreta de los gráficos de liberación de cada muestra se adjunta al final del documento el ANEXO III donde se representa la liberación individual de las membranas de *electrospinning* y de los films de *solvent casting* a todas las concentraciones de ácido hialurónico estudiadas así como su liberación de tetraciclina.

7.5 ESTUDIO DEL ENSAYO DE RESISTENCIA AL DESGARRO

En el estudio del ensayo de resistencia al desgarro de los constructos se determinaron los valores medios del módulo elástico, la tensión en el límite elástico y la tensión y la deformación de rotura del material. Para determinar estos parámetros se representaron las gráficas de tensión-deformación de cada muestra. En la figura 63 se muestra un ejemplo del cálculo de estos datos a partir del gráfico obtenido con una muestra de un hidrogel al 2% de HA y conteniendo una membrana de emulsión. Para la obtención del módulo elástico se representa la recta de la zona elástica, a partir de ella se obtiene el módulo elástico ya que se corresponde con su pendiente. En la figura 64 se observa la representación de esta recta, así como su ecuación.

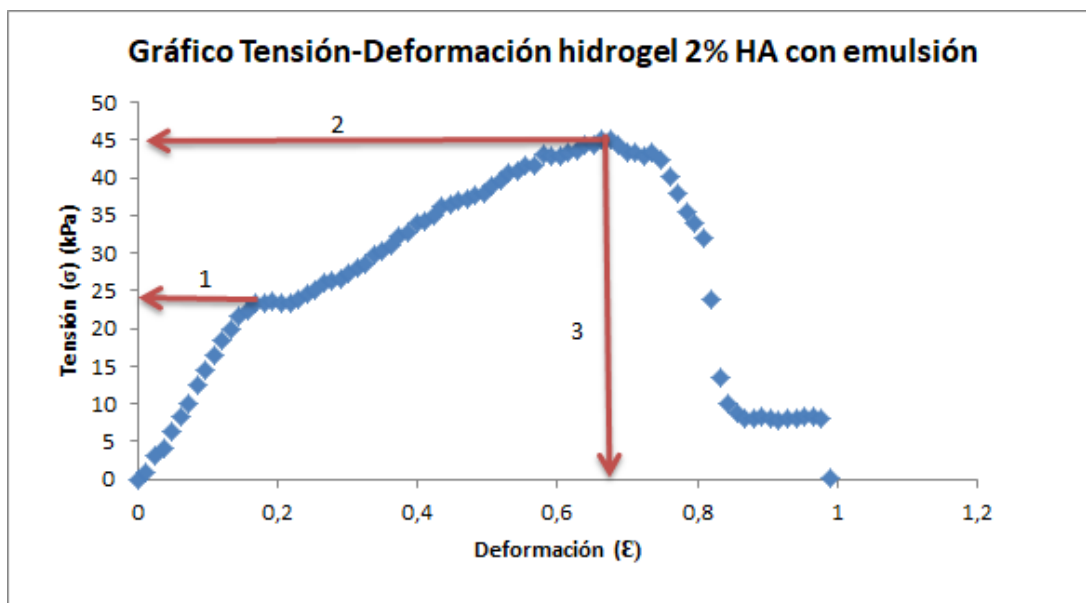


Figura 63. Gráfico de tensión-deformación en el ensayo de desgarro de la muestra de hidrogel entrecruzado al 2% de HA y con una membrana de *electrospinning* con emulsión.

A partir de este gráfico se hallaron estos parámetros siendo 1) la tensión en el límite elástico; 2) la tensión de ruptura; y 3) la deformación de ruptura. El módulo elástico se obtuvo a partir de la recta del límite elástico de la figura 64

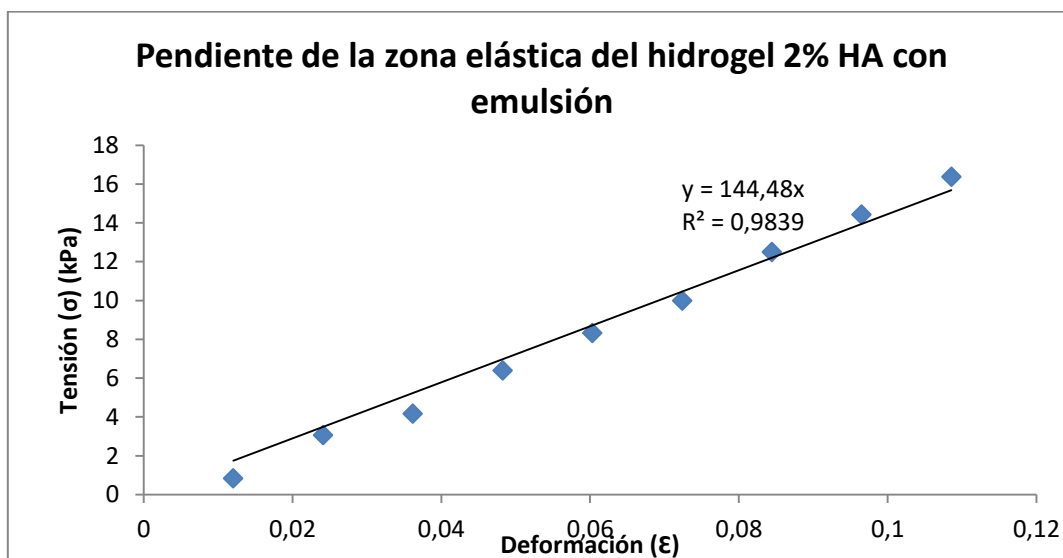


Figura 64. Recta de elasticidad en el ensayo de desgarro de la muestra de hidrogel entrecruzado al 2% de HA y con una membrana de *electrospinning* con emulsión.

Para el análisis de los resultados se estudiaron los datos obtenidos separando entre aquellos con emulsión y aquellos sin emulsión. De este modo se compara el efecto de la concentración de ácido hialurónico en las propiedades mecánicas.

Se espera de antemano que las membranas sin ácido hialurónico sean las más resistentes (es decir que tengan mayor módulo de elasticidad) debido a que al no estar entrecruzadas no poseen el hidrogel entre sus cadenas y haciendo más resistente al material. En segundo lugar, se espera que los constructos al 2% sean más resistentes que los del 1% ya que al estar los dos entrecruzados, el de mayor entrecruzamiento debería tener mayor fuerza en sus cadenas permitiendo un desgarro más costoso.

Se representó en primer lugar en una misma gráfica la variación del módulo elástico en función de las concentraciones, tanto para las membranas con emulsión como para las membranas sin emulsión. Este gráfico se observa en la figura 65

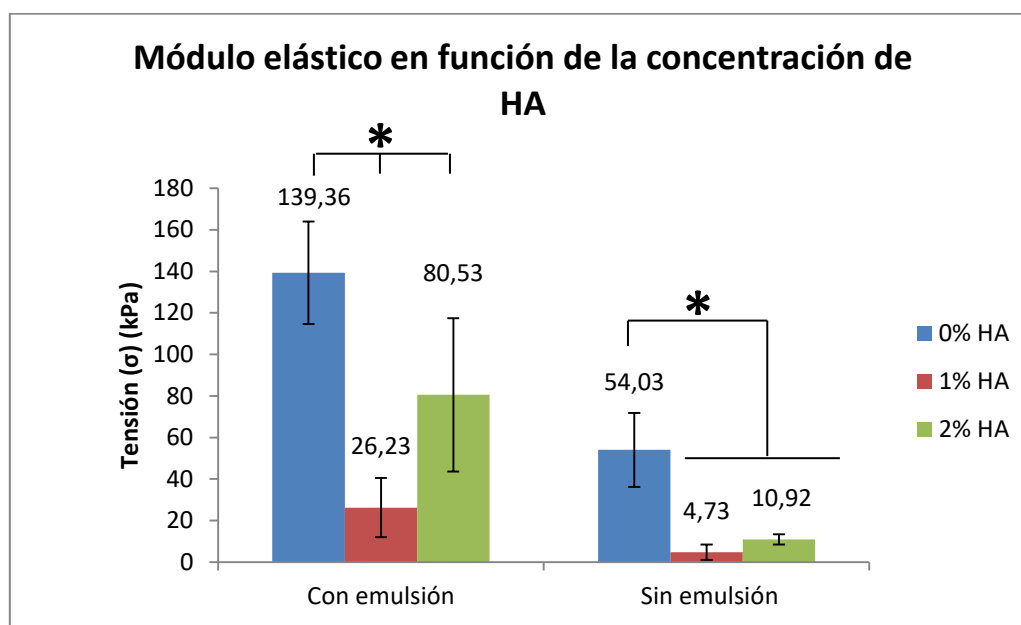


Figura 65. Módulo elástico de los constructos con membranas de *electrospinning* sin emulsión a diferentes concentraciones de ácido hialurónico

Este gráfico aporta información sobre el módulo elástico de las membranas de *electrospinning* tanto con emulsión como sin emulsión para las concentraciones de ácido hialurónico al 0%, 1% y 2%.

Para las membranas de *electrospinning* con emulsión, las membranas sin ácido hialurónico presentaron un módulo elástico de 139,36 kPa y fueron más resistentes que las membranas al 1% y 2% de HA. Esto se debe a la debilidad de las propiedades mecánicas que aporta el hidrogel. La inclusión del hidrogel permite que sea más fácil el desplazamiento del hilo de cobre sobre el material y por ello el módulo elástico de los constructos es menor que el de las membranas sin hidrogel, la resistencia es menor ya que al estar las membranas empapadas por el hidrogel se facilita la rotura de

las fibras. Las membranas de *electrospinning* al 1% fueron las de menor módulo elástico, presentando en este caso un módulo elástico de 26,23 kPa. Estas son las membranas que menor capacidad de reticulación tienen, lo que les aporta menor resistencia. Las membranas al 2% fueron por su parte más resistentes que las membranas al 1%, estas primeras tuvieron un módulo elástico medio de 80,53 kPa. Por otra parte, se observa que para estas membranas con emulsión existen diferencias significativas del módulo elástico entre cada una de las concentraciones.

En el estudio sin emulsión se obtuvieron resultados similares, pero con menor módulo elástico para cada concentración, debido a la mayor heterogeneidad de las fibras. De nuevo, para los constructos de *electrospinning* sin emulsión las membranas al 0% fueron las de mayor módulo elástico y aquellas al 2% de concentración fueron más resistentes que las membranas al 1% debido a que al tener mayor cantidad de HA poseen mayor entrecruzamiento y son más resistentes. Los módulos elásticos obtenidos para las membranas al 0% de HA, 1% de HA y 2% de HA fueron de 54,03 kPa, 4,73 kPa y 10,92 kPa respectivamente. En este caso, solo se observan diferencias significativas entre la membrana al 0% de HA y las otras dos concentraciones.

En general, se observa que el módulo elástico de las membranas con emulsión es siempre mayor que el de las membranas sin emulsión para todas las concentraciones de HA. Para observar con más detalle este razonamiento, en la figura 66 se compara el efecto de la emulsión en las diferentes concentraciones de ácido hialurónico para el módulo elástico. Para ello se representa en forma de barras los módulos elásticos de todas las concentraciones analizadas para las membranas con emulsión (en azul) y sin emulsión (en rojo).

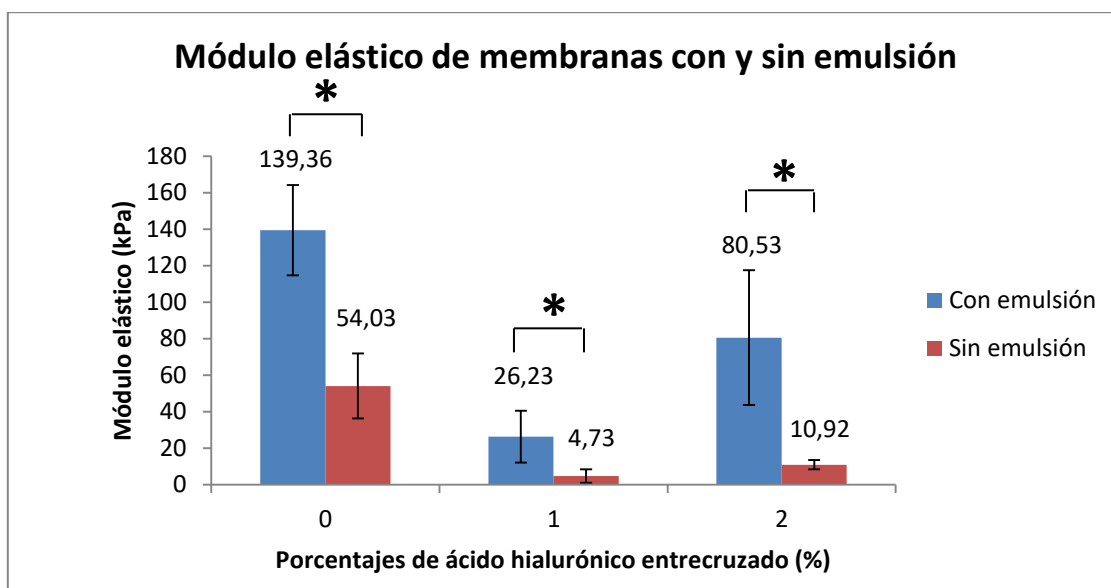


Figura 66. Efecto de la emulsión en el módulo elástico de los diferentes constructos con las membranas de *electrospinning* según las diferentes concentraciones de ácido hialurónico

De forma general, las membranas fabricadas con emulsión presentan mayor módulo elástico que las membranas sin emulsión en todas las concentraciones de ácido hialurónico estudiadas.

La diferencia del módulo elástico de las membranas con recubrimiento a una misma concentración se va incrementando a medida que se aumenta la concentración de hialurónico. La diferencia entre las membranas sintetizadas al 2% de HA es similar a la diferencia entre las membranas al 0% a pesar de que estas últimas tienen mayor módulo elástico. La presencia de la emulsión en las membranas muestra diferencias significativas entre todas las membranas con emulsión y sin emulsión a la misma concentración. Por ello, se deduce que la realización de la emulsión afecta a las propiedades mecánicas de las membranas siempre y cuando estén incluidas en el hidrogel. La emulsión y el proceso de *electrospinning* proporcionan fibras porosas que permiten una mayor resistencia de los constructos. Por lo tanto, se deduce que la fabricación de las membranas a partir de la emulsión afecta al módulo elástico aumentándolo considerablemente.

Para los demás parámetros estudiados en el ensayo de desgarro, se representa las gráficas que representan la influencia de la emulsión y de las diferentes concentraciones de ácido hialurónico en restantes parámetros estudiados.

En primero lugar la figura 67 estudia el efecto del límite elástico para las diferentes concentraciones de HA tanto para los constructos con membranas de *electrospinning* con emulsión y sin emulsión.

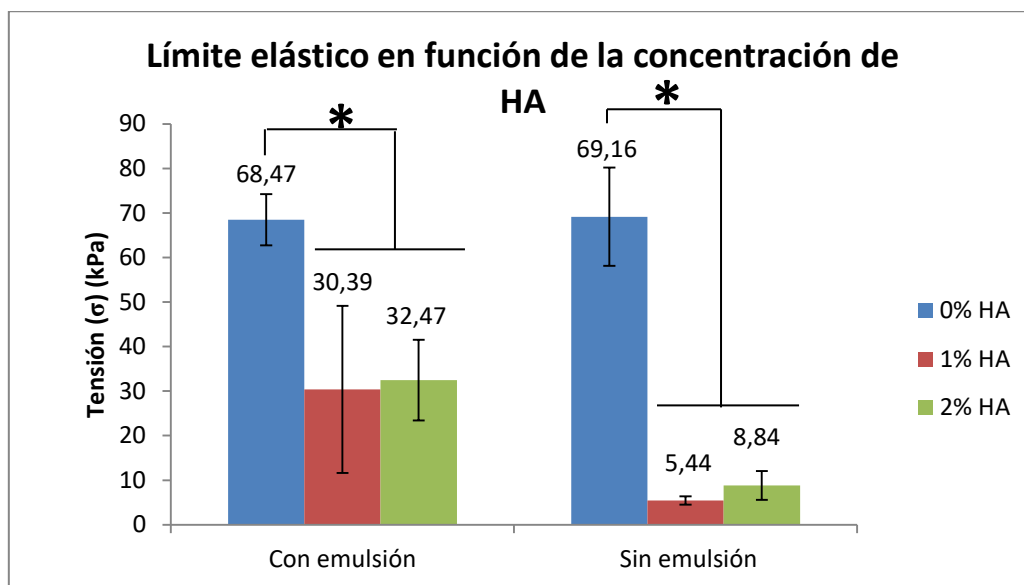


Figura 67. Límite elástico de los constructos con emulsión y sin emulsión a según las diferentes concentraciones de ácido hialurónico

En esta última figura se observa que las membranas al 0% de HA son las que poseen en mayor límite elástico tanto en las membranas con emulsión (68,47 kPa) como las que no están emulsionadas (69,16 kPa), siendo este parámetro similar en ambos casos. El límite elástico en los constructos al 1% de HA y 2% de HA son también similares entre ellos en las membranas de emulsión y en las membranas sin emulsión. En estas primeras membranas los constructos al 2% son ligeramente superiores en cuanto a tensión del límite elástico siendo de 32,47 kPa frente a 30,39 kPa en el 1% de HA. En los constructos sin emulsión sucede lo mismo pero en este caso con menor tensión en el

límite elástico para ambas concentraciones siendo la del 2% de HA de 8,84 kPa y la del 1% de HA de 5,44. La diferencia entre estos resultados no fue estadísticamente significativas en el límite elástico de las constructos con y sin emulsión para los constructos sintetizados con 1% de HA y con 2% de HA. En cambio, si existieron estas diferencias con las membranas sin hidrogel en ambos casos.

El gráfico de la figura 68 proporciona información sobre la tensión de ruptura para las diferentes concentraciones de HA tanto para los constructos con membranas de *electrospinning* con emulsión y sin emulsión.

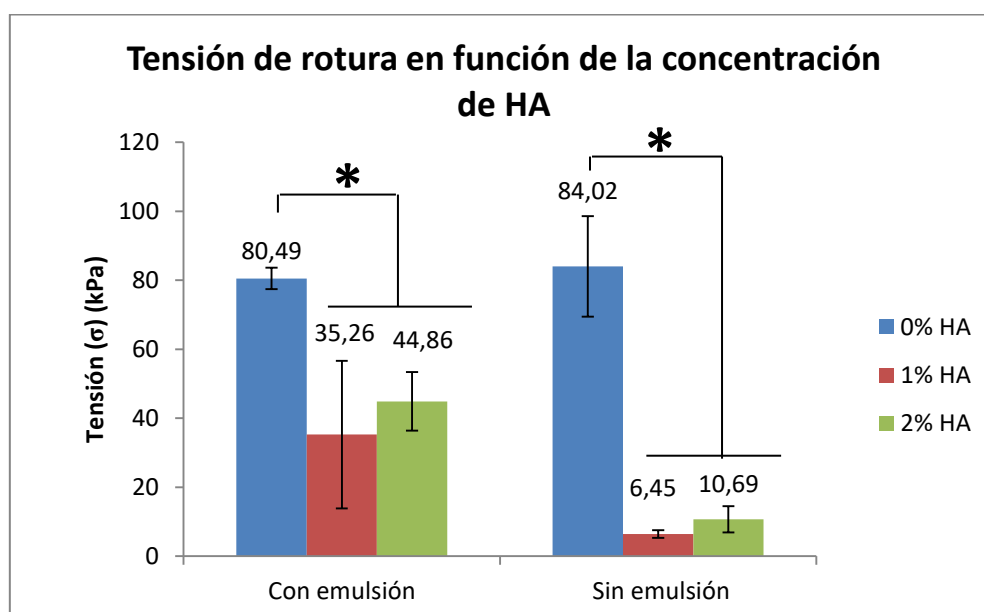


Figura 68. Tensión de ruptura de los constructos con emulsión y sin emulsión a según las diferentes concentraciones de ácido hialurónico

Respecto a la tensión de ruptura de los constructos se observan resultados similares a los anteriores en la tensión del límite elástico. Se observan diferencias estadísticamente significativas únicamente entre las membranas de 0% de HA y ambos constructos de 1% y 2% de HA, tanto para las membranas con emulsión como sin emulsión. Esta tensión para las membranas sin hidrogel fue de 80,49 kPa y de 84,02 kPa para las membranas con emulsión y sin emulsión respectivamente. Para las concentraciones de ácido hialurónico en las membranas con emulsión se obtuvo como tensión máxima de ruptura 32,26 kPa para constructos al 1% y 44,86 kPa para los de 2%. En cambio, para las membranas sin emulsión y estas concentraciones se obtuvo menor tensión siendo de 6,45 kPa para 1% y de 10,69 kPa para 2%. La tensión de rotura para las membranas al 0% con emulsión y sin emulsión fue similar. En cambio, para las otras dos concentraciones esta tensión fue mayor en los constructos con hidrogel de recubrimiento, lo que puede ser debido a que la interfase entre fibras y gel es mejor con emulsión, debido a su porosidad.

Por último, el gráfico de la figura 69 proporciona información sobre la deformación de ruptura para las diferentes concentraciones de HA tanto para los constructos con membranas de *electrospinning* con emulsión y sin emulsión.

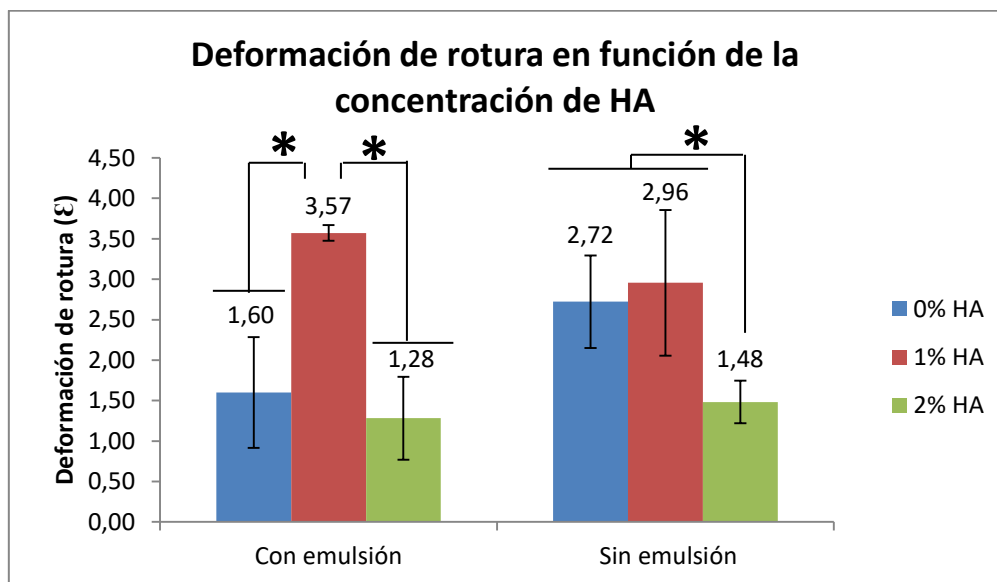


Figura 69. Deformación de ruptura de los constructos con emulsión y sin emulsión a según las diferentes concentraciones de ácido hialurónico

El gráfico del análisis de la deformación a la rotura muestra que los constructos al 1% de HA son las que sufren mayor deformación hasta su ruptura. La deformación máxima que sufren aquellas con emulsión fue de 3,57 mientras que la de las membranas sin emulsión fue de 2,96. Estos valores se suman a los 22 mm iniciales de longitud de las membranas para saber su longitud final justo antes del punto de su ruptura. Los demás constructos al 0% de HA y al 2% en con las membranas con emulsión sufrieron una deformación de 1,6 y 1,28 respectivamente y ambas deformaciones son estadísticamente significativas respecto a las de 2% de concentración. En cambio, para las membranas sin emulsión, la menor deformación se dio en la de 2% de HA siendo esta de 1,48. Respecto a la membrana sin hidrogel entrecruzado en este caso se observa un resultado similar al de 1% siendo la deformación a ruptura del 0% de HA de 2,72 y consiguiendo así únicamente diferencias significativas entre de las membranas al 0% y al 2% respecto a las de 2% HA. Por ello si se compara las dos membranas contenidas en el hidrogel a sus diferentes concentraciones se observa que son dependientes, es decir, que la concentración empleada influirá en la deformación final del constructo.

8. CONCLUSIONES

En este Trabajo Final de Grado se ha sintetizado y caracterizado los constructos elaborados a partir de la reticulación de ácido hialurónico modificado con tiramina así como las membranas incluidas en los hidrogeles que actuaban como refuerzo mecánico y como medio para la liberación de la tetraciclina. Se varió la concentración empleada de ácido hialurónico en la reticulación del hidrogel para estudiar el efecto de la concentración de este compuesto en los constructos durante los diferentes ensayos realizados.

Las conclusiones obtenidas fueron las enumeradas a continuación:

Para la síntesis de hidrogeles de ácido hialurónico se puede emplear la tiramina para modificar las cadenas de ácido hialurónico y permitir el entrecruzamiento del hidrogel. El grado de sustitución de la tiramina es aproximadamente de un 4,7%.

Para la fabricación de las membranas de *electrospinning* con emulsión las condiciones óptimas del proceso por las cuales se obtuvieron fibras de diámetro homogéneas y con una distribución proporcional fueron de 1mL/hora de flujo, 14 cm de distancia entre aguja y colector, un voltaje de 18kV y una concentración de PLLA de 7%.

Debido a la mayor concentración de ácido hialurónico que presentan los hidrogeles al 2% su tiempo de gelificación es más rápido que el de los hidrogeles al 1% de ácido hialurónico.

Las propiedades mecánicas de los constructos bajo el ensayo de desgarro varían en función de si las membranas de *electrospinning* han sido fabricadas mediante emulsión o sin emulsión. La emulsión mejora las propiedades mecánicas del material debido a la porosidad de las fibras. En cuanto a la concentración de ácido hialurónico se puede observar que la concentración que proporciona mayor resistencia es la de 2% de ácido hialurónico debido a su mayor entrecruzamiento. No obstante, esta concentración permite un menor estiramiento del material hasta su rotura que los constructos al 1% de ácido hialurónico.

La concentración de ácido hialurónico como recubrimiento permite la liberación controlado de la tetraciclina. A mayor concentración de ácido hialurónico mayor barrera de difusión del medicamento y menor cantidad de medicamento liberado. Las membranas sin recubrimiento son por ello las que liberan la mayor cantidad de tetraciclina contenida en los poros de las fibras.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Z.Zhang, «Injectable biomaterials for stem cell delivery and tissue regeneration,» *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 17, nº 1, pp. 49-62, 2017.
- [2] R. Langer y J. Vacanti, «Tissue Engineering,» *Science*, vol. 6, nº 5110, pp. 260-920, 1993.
- [3] D.Shi, *Introduction to biomaterials*, World Scientific, 2006.
- [4] G. Khang, M. S. Kim y H. B. Lee, *A manual for biomaterials/Scaffold fabrication technology*, World Scientific, 2007.
- [5] J. A. Álvarez, M. Flores, R. I. Hernández, H. Martínez, C. E. Escamilla y E. Rivera, «Una segunda piel: tratamiento con sustitutos dérmicos,» *Revista médica MD*, vol. 4, nº 1, pp. 37-41, 2012.
- [6] L. Weber, E. Kirsch, P. Müller y T. Krieg, «Collagen Type Distribution and Macromolecular Organization of Connective Tissue in Different Layers of Human Skin,» *The journal of investigate dermatology*, vol. 82, nº 2, pp. 156-160, 1984.
- [7] J. Kanitakis, «Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin,» *European Journal of Dermatology*, vol. 12, nº 4, pp. 390-399, 2002.
- [8] C. Whittle y G. Baldassare, «Ultrasonografía de piel y anexos,» *Revista chilena de radiología*, vol. 10, nº 2, pp. 81-88, 2004.
- [9] F. Netter, *Atlas de anatomía humana*, Masson SA, 2001.
- [10] M. Balasubramani, T. Kumar y M. Babu, «Skin Substitutes: A review,» *Burns*, vol. 27, nº 5, pp. 534-544, 2001.
- [11] K. Halprin, «Epidermal 'turnover time': a reexamination,» *Br J Dermatol*, vol. 86, nº 1, pp. 14-19, 1972.
- [12] B. Frost, G. Weinstein y E. Van Scott, «The ichthyosiform dermatoses: autoradiographic studies of epidermal proliferation.,» *J Invest Dermatol*, vol. 47, nº 6, pp. 561-567, 1966.
- [13] S. Böttcher-Haberzeth, T. Biedermann y E. Reichmann, «Tissue engineering of skin,» *Burns*, vol. 36, nº 4, pp. 450-460, 2010.
- [14] B. Ascher, *Inyection treatments in cosmetics surgery*, Informa Healthcare, 2009.
- [15] D. Matoltsy AG, «Keratinization,» *J Invest Dermatol*, vol. 67, nº 1, pp. 20-25, 1975.

- [16] A. Cochran, «The incidence of melanocytes in normal skin,» *J Invest Dermatol*, vol. 55, nº 1, pp. 65-70, 1970.
- [17] K. Wolff y G. Stingl, «The Langerhans cell,» *J Invest Dermatol*, vol. 80, nº 5, pp. 17-21, 1983.
- [18] M. Grant y D. Prockop, «The biosynthesis of collagen,» *N Engl J Med*, vol. 286, nº 3, pp. 194-199, 1972.
- [19] P. Shakespeare, «Burn wound healing and skin substitutes,» *Burns*, vol. 27, nº 5, pp. 517-522, 2001.
- [20] D. Severian, *Polymeric Biomaterials*, Jassy: Dekker, Marcel, 1994.
- [21] P. G. Shakespeare, «The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries,» *Clinics in Dermatology*, vol. 23, nº 4, pp. 413-418, 2005.
- [22] M. Siemionow, *Plastic and reconstructive surgery*, Springer, 2010.
- [23] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen y J. Lemons, *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*, Academic Press, 2004.
- [24] G. Dan Mogosanu y A. Mihai Grumezescu, «Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 463, nº 2, pp. 127-136, 2014.
- [25] S. Hacker, «Paracrine Factors from irradiated Peripheral Blood Monocuclear Cells Improve skin Regeneration and Angiogenesis in a Porcine Burn Model,» *Scientific Reports*, vol. 6, nº 25168, pp. 251-268, 2016.
- [26] G. Mogos, G. Popescu, C. Busuioc, H. Pârvanescu y I. Lascăr, «Natural products locally modulators of the cellular response: therapeutic perspectives in skin burns,» *Rom. J. Morphol. Embryol.*, vol. 53, nº 2, pp. 249-262, 2012.
- [27] S. Park, H. Jang, Y. Choi, J. Cha, S. Son, S. Han, J. Kim, W. Lee y H. Suh, «Preparation and characterization of biodegradable anti-adhesive membrane for peritoneal wound healing,» *J.Mater.Sci.Mater.Med*, vol. 18, nº 3, pp. 475-482, 2007.
- [28] B. Atiyeh, S. Hayek y S. Gunn, «New technologies for burn wound closure and healing,» *Burns*, vol. 31, nº 8, pp. 944-956, 2005.
- [29] M. Singh, S. Saraf, A. Vyas, V. Jain y D. Singh, «Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances,» *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*, vol. 41, nº 3, pp. 202-2012, 2013.

- [30] H. Chung y T. Park, «Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering,» *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, nº 4-5, pp. 249-262, 2007.
- [31] L. Guerra, E. Dellambra, L. Panacchia y E. Paionni, «Tissue engineering for dam-aged surface and lining epithelia: stem cells, current clinical applications, and available engineered tissues,» *Tissue Eng. B Rev*, vol. 15, nº 2, pp. 91-112, 2009.
- [32] M. Naghibzadeh, «Nanofibers for skin regeneration,» *Trends Biomater. Artif Organs*, vol. 26, nº 2, pp. 86-102, 2012.
- [33] W. Zhong, M. Xing y H. Maibach, «Nanofibrous materials for wound care,» *Cutan. Ocul. Toxicol*, vol. 29, nº 3, pp. 143-152, 2010.
- [34] N. Das, T. Bera y A. Mukherjee, «Bimaterial hydrogels for different biomedical applications,» *Int. J. Pharma Bio Sci*, vol. 3, nº 3, pp. 586-595.
- [35] L. Kuen Yong, J. Lim, K. Yun Ok, L. Seung Jin y P. Won Ho, «Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, nº 12, pp. 1020-1032, 2009.
- [36] M. Zilberman, *Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration*, Springer, 2011.
- [37] S. Dumitriu, *Polymeric Biomaterials*, New York: Marcel Dekker, INC, 2002.
- [38] L. Cato T. y N. Laksmi S., *Nanotechnology and Tissue Engineering. The scaffold*, CRC Press, 2008.
- [39] A. Young-Hyeon, Y. Seung Jung, K. In Seon, K. Su-Hwan y M. Jeong-Mi, «Hydrogel Functionalized Janus Membrane,» *Advanced Science News*, vol. 6, nº 5, pp. 258-267, 2016.
- [40] L. Qin, H. K. Genant, J. Griffith y K.-S. Leung, *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffolds Materials*, Springer, 2007.
- [41] A. S. Martínez. (2017). *Síntesis y caracterización de membranas electrohiladas de PLA para liberación de un fármaco en ingeniería tisular de piel* (Trabajo Fin de Grado). Universitat Politècnica de València, España.
- [42] A. Darr y A. Calabro, «Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels,» *J. Mater. Sci. Med.*, vol. 20, nº 1, pp. 33-44, 2009.

ANEXOS

ANEXO I: IMÁGENES DE LOS EQUIPO EMPLEADOS EN EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las figuras adjuntadas en este anexo muestran las fotos de todos los equipos que se han empleado durante la realización del procedimiento experimental del trabajo.



Figura 70. Imagen de la balanza de precisión empleada en el procedimiento experimental.



Figura 71. Imagen de espectrofotómetro empleado en el procedimiento experimental para la determinación del grado de reticulación y el estudio de la liberación de fármaco.



Figura 72. Imagen del Vórtex empleado en el procedimiento experimental para la realización de la emulsión.

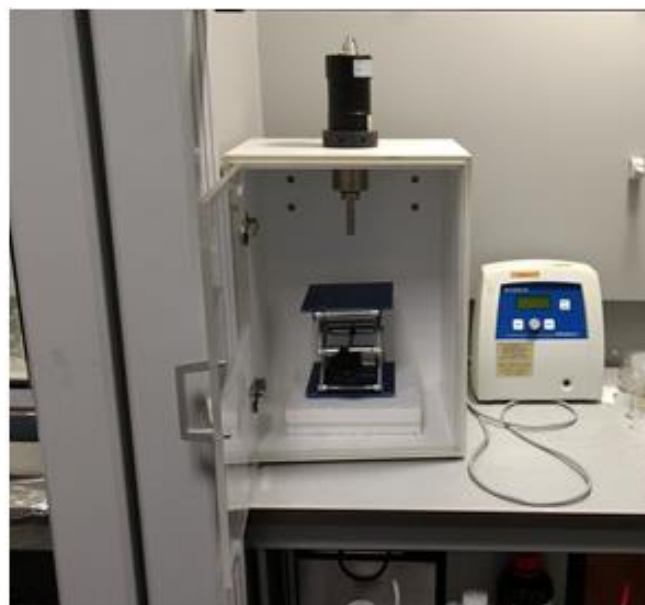


Figura 73. Imagen del sonicador empleado en el procedimiento experimental para la realización de la emulsión.



Figura 74. Imagen de la fuente de alimentación empleada en el procedimiento experimental para el proceso de *electrospinning*.



Figura 75. Imagen del microscopio SEM empleado en la obtención de las fotos de las membranas de *electrospinning* y los films de *solvent casting*.



Figura 76. Imagen de la bomba de vacío empleada en el procedimiento experimental de la liberación de fármaco.

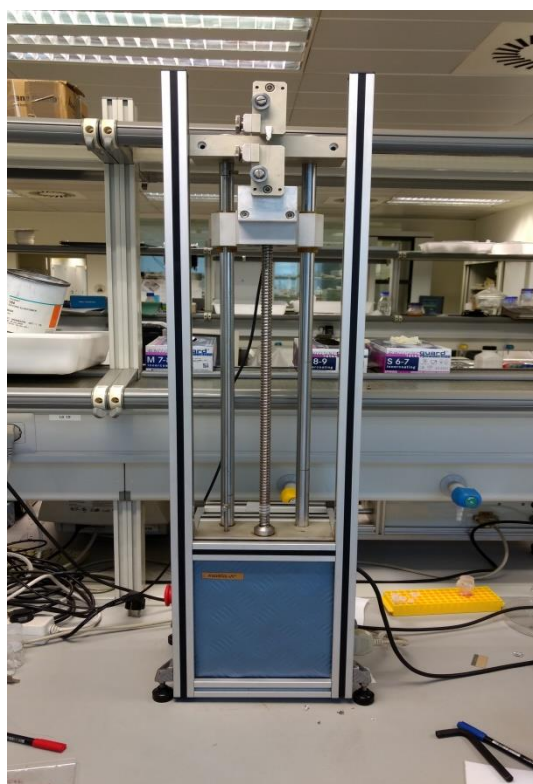


Figura 77. Imagen del equipo MICROTEST empleado en el procedimiento experimental para el estudio del ensayo de desgarro.

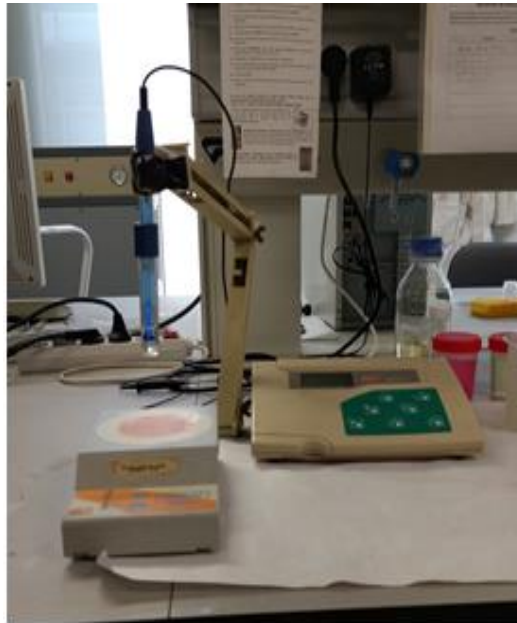


Figura 78. Imagen del pH-metro empleado en el procedimiento experimental.



Figura 79. Imagen del reómetro empleado en el procedimiento experimental del ensayo de reometría.

ANEXO II: OBTENCIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE SUSTITUCIÓN.

Para cuantificar la cantidad de tiramina injertada en ácido hialurónico de los diferentes lotes, se empleó una recta de calibrado que representa la absorbancia de las disoluciones de tiramina de concentración conocida. Las concentraciones de la curva de calibrado empleadas fueron de: 0, 0'00625, 0'0125, 0'025, 0'05, 0'1 y 0'125.

La realización de estas concentraciones se efectuó por dilución a partir de una disolución de 2 mg de tiramina en 1 mL. Por lo tanto, se disolvió en primer lugar en un eppendorf (de 1,5 mL de capacidad total) 2 mg de tiramina en 1 mL de agua desionizada. A partir de esta disolución, se tomaron alícuotas de un volumen determinado y se rellenaron con agua desionizada hasta 1 mL de disolución total en diferentes eppendorfs, de este modo se obtuvieron las concentraciones indicadas. La tabla 14 indica la cantidad de alícuota inicial tomada para preparar las concentraciones desde la mayor hasta la menor.

Tabla 14. Concentraciones de tiramina y cantidad a tomar para la dilución en la recta de calibrado de tiramina.

Concentración de tiramina (mg/mL)	Cantidad necesaria a tomar de la disolución preparada inicialmente de 2 mg de tyr/mL (µL)
0,125	62,5
0,1	50
0,05	25
0,025	12,5
0,0125	6,25
0,00625	3,1
0	0

Con estas concentraciones se realizaba una recta de calibrado para cada lote preparado (se estudió el grado de sustitución en 3 lotes de ácido hialurónico modificado con tiramina). Estas rectas de calibrado representan la variación de la concentración de tiramina frente a la absorbancia. De esta manera se podrá determinar la cantidad de injerto de grupos tiramina en ácido hialurónico mediante la absorbancia y el empleo de la recta de calibrado. En la tabla 15 y la figura 80 se muestra un ejemplo del lote número 1 donde se adjunta la tabla que representa los valores de absorbancia respecto a las concentraciones de tiramina y la recta de calibrado obtenida.

Tabla 15. Valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de ácido hialurónico modificado con tiramina.

Concentración de tiramina (mg/mL)	Absorbancia
0,125	0,4828
0,1	0,4022
0,05	0,208
0,025	0,1021
0,0125	0,0493
0,00625	0,0249
0	0

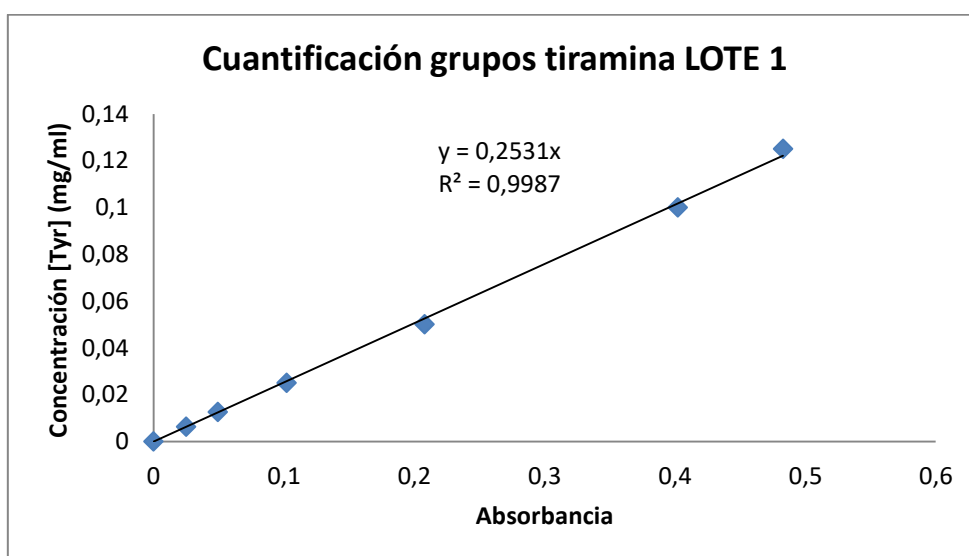


Figura 80. Recta de calibrado que representa la concentración de tiramina respecto a la absorbancia del ácido hialurónico modificado con tiramina.

Por lo tanto de la recta de calibrado del lote 1 se obtiene la relación de la concentración de tiramina respecto de la absorbancia (ecuación I)

$$\text{Concentración de tiramina (mg Tyr/mL d}^{on}\text{)} = 0,2531 \cdot \text{Absorbancia} \quad (I)$$

ANEXO III: ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE LA TETRACICLINA

Se adjuntan en este anexo las gráficas obtenidas individualmente de la liberación acumulada de la tetraciclina para cada constructo estudiado.

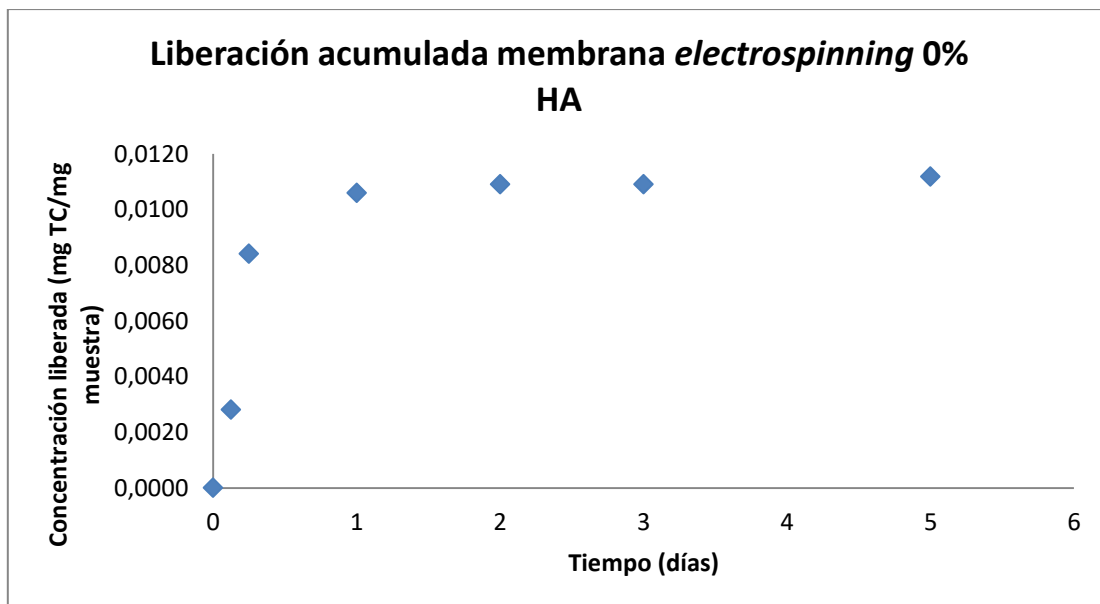


Figura 81. Liberación acumulada de tetraciclina mediante las membranas de *electrospinning* con una concentración de 0% de ácido hialurónico.

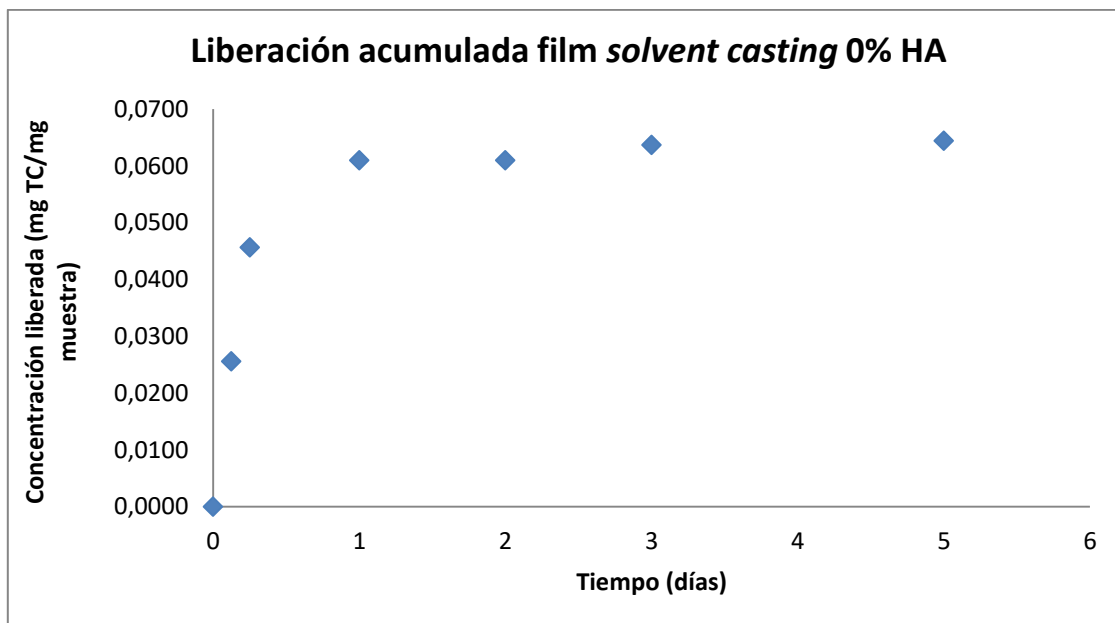


Figura 82. Liberación acumulada de tetraciclina mediante los films de *solvent casting* con una concentración de 0% de ácido hialurónico.

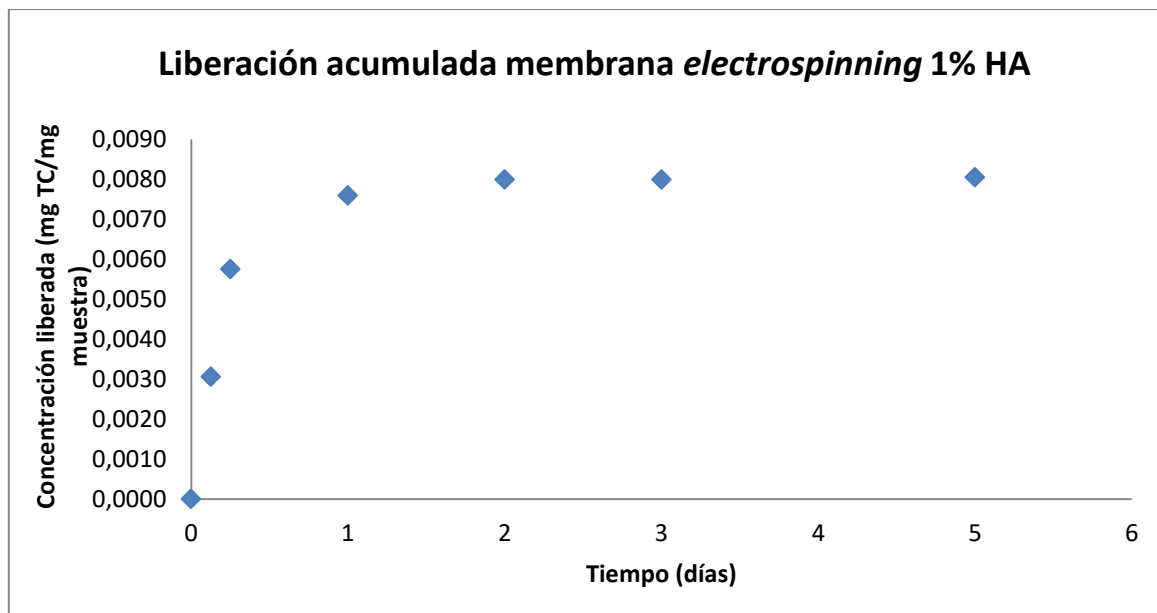


Figura 83. Liberación acumulada de tetraciclina mediante las membranas de *electrospinning* con una concentración de 1% de ácido hialurónico.

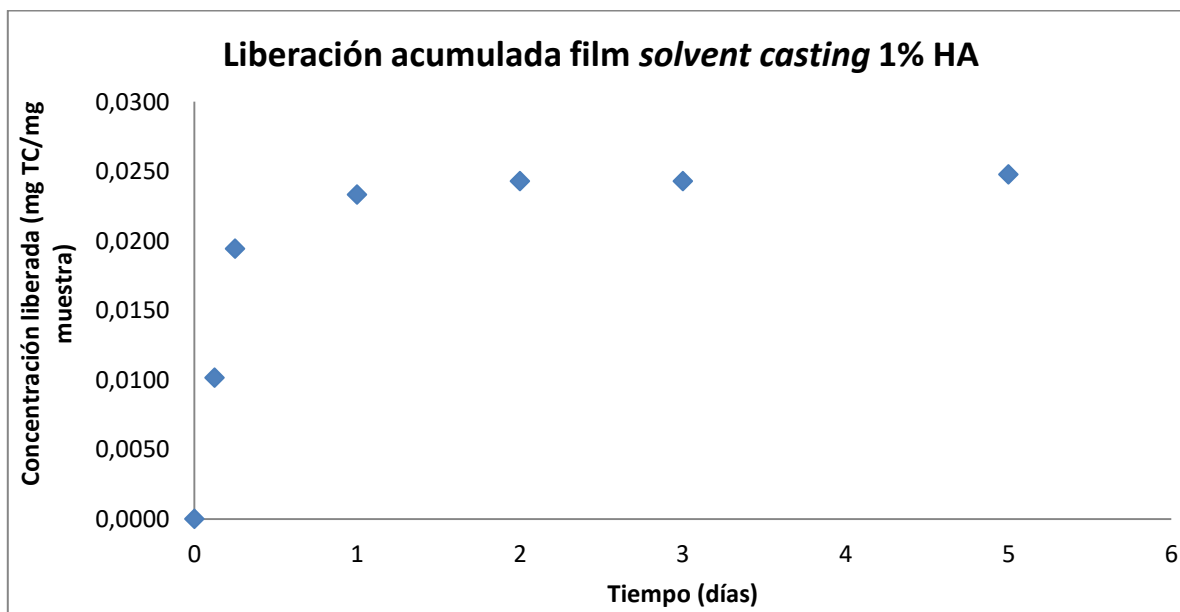


Figura 84. Liberación acumulada de tetraciclina mediante los films de *solvent casting* con una concentración de 1% de ácido hialurónico.

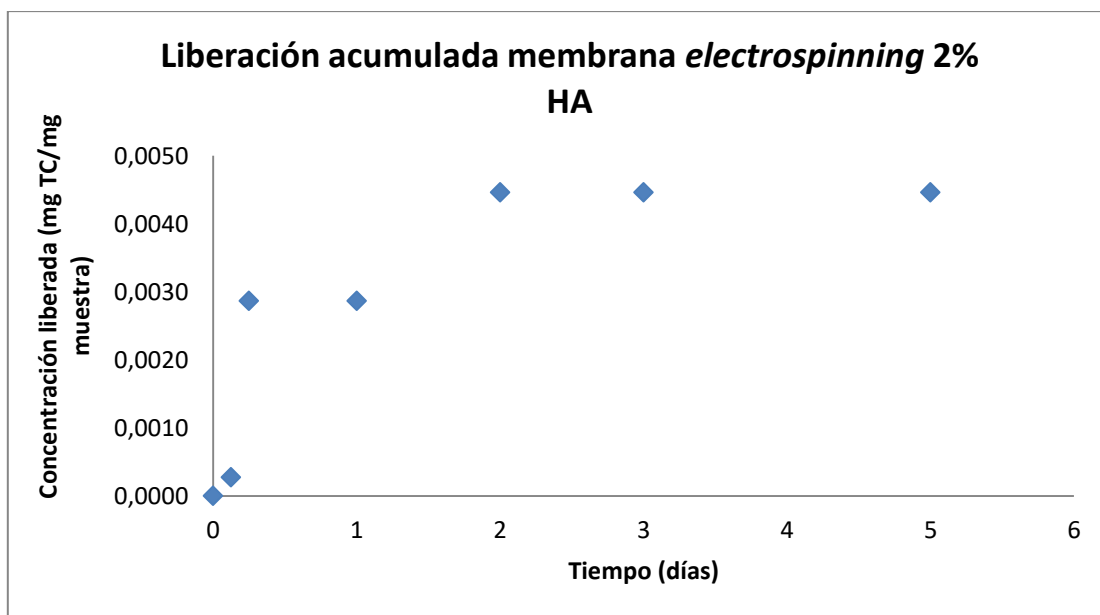


Figura 85. Liberación acumulada de tetraciclina mediante las membranas de *electrospinning* con una concentración de 2% de ácido hialurónico.

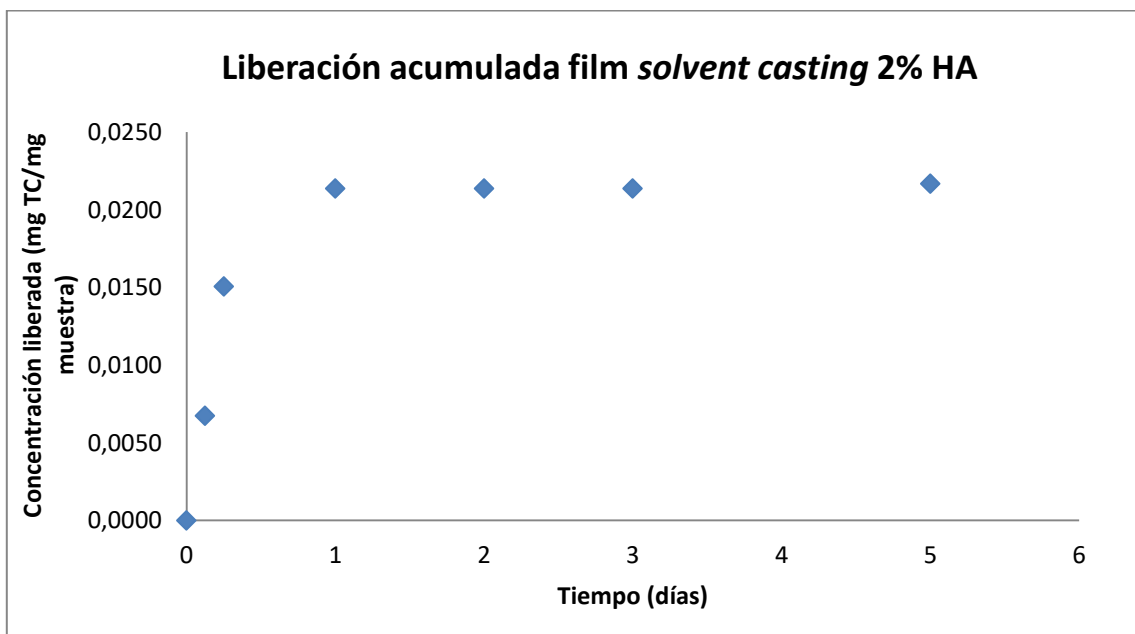


Figura 86. Liberación acumulada de tetraciclina mediante los films de *solvent casting* con una concentración de 2% de ácido hialurónico.

Se adjunta la tabla 16. Esta tabla recoge de las medias de las concentraciones en la liberación en función del tiempo para cada constructo y para cada concentración.

Tabla 16. Medias obtenidas de las concentraciones acumuladas de tetraciclina en función del tiempo en la liberación de tetraciclina para los diferentes constructos y concentraciones.

Concentraciones acumuladas de tetraciclina (mg de tetraciclina/mg de muestra)						
Tiempo (días)	Film <i>solvent casting</i> 0% HA	Membrana <i>electrospinning</i> 0% HA	Film <i>solvent casting</i> 1% HA	Membrana <i>electrospinning</i> 1% HA	Film <i>solvent casting</i> 2% HA	Membrana <i>electrospinning</i> 2% HA
0,125	0,0255	0,0028	0,0101	0,0031	0,0067	0,0003
0,25	0,0456	0,0084	0,0194	0,0058	0,0151	0,0029
1	0,0610	0,0106	0,0233	0,0076	0,0214	0,0029
2	0,0610	0,0109	0,0243	0,0080	0,0214	0,0045
3	0,0637	0,0109	0,0243	0,0080	0,0214	0,0045
5	0,0644	0,0112	0,0248	0,0081	0,0217	0,0045

DOCUMENTO 2:

PRESUPUESTO

ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO.....	107
2. CUADRO MANO DE OBRA.....	107
3. CUADRO MAQUINARIA.....	108
4. CUADRO MATERIALES.....	109
5. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS.....	111
6. PRESUPUESTOS PARCIALES.....	116
7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN.....	118

1. INTRODUCCIÓN DEL PRESUPUESTO

En el presente documento se estudia el presupuesto del proyecto para determinar su viabilidad económica mediante el cálculo del coste de inversión que requeriría el proyecto. En este estudio económico se recogieron como capítulos del presupuesto los apartados que en el procedimiento experimental. Para determinar la viabilidad económica del trabajo se presupuestó la mano de obra, la maquinaria, los materiales y equipos llevados a cabo en cada capítulo y los trabajos realizados. A partir de estos datos se determinó el cuadro de precios descompuestos por capítulos y posteriormente el presupuesto parcial de cada capítulo.

Finalmente se determinó el presupuesto de ejecución material, el presupuesto de ejecución por contrata y finalmente el presupuesto general del proyecto o presupuesto base de licitación.

Los recursos del presupuesto se han clasificado asignándoles un código según su naturaleza. La siguiente tabla 17 muestra la descripción de cada código.

Tabla 17. Tabla de códigos según las diferentes categorías de recursos empleados en la realización del presupuesto

Código	Descripción del código
M.O	Mano de obra
M.Q	Maquinaria
E	EPIS
M.L	Material de laboratorio

2. CUADRO MANO DE OBRA

El cuadro de la mano de obra se describe en la siguiente tabla 18. Se ha considerado como mano de obra la del autor del TFG (ingeniero químico) aunque no ha recibido ningún honorario.

Tabla 18. Cuadro de precios mano de obra

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Total (€)
1	MO.01	h	Graduado en ingeniería química	13,50	300	4.050,00
2	MO.02	h	Director responsable del proyecto	24,00	47	1.128,00
3	MO.03	h	Técnico de laboratorio	12,50	5	62,50
4	MO.04	h	Co-director responsable del proyecto	19,50	70	1.365,00
Precio total mano de obra (€)						6.605,50

3. CUADRO MAQUINARIA

Para los equipos utilizados se ha calculado la amortización como se muestra en la ecuación II, con un periodo de amortización de 10 años. Las componentes de la ecuación son el coste del equipo al adquirirlo (Cost), el tiempo de uso durante los ensayos que fue de 6 meses (t_{uso}) y el periodo de amortización (Per_{amort}).

$$A = \frac{Cost \cdot t_{uso}}{Per_{amort}} \quad (II)$$

En la tabla 19 se recoge el cuadro de equipos y maquinaria utilizados en la realización del proyecto

Tabla 19. Cuadro de maquinaria

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	MQ.01	h	Balanza analítica de precisión de la marca Mettler Toledo, modelo AX205.	0,20	13,8	2,76
2	MQ.02	h	Bandelin Sonoplus HD 3100 ultrasonic homogeneizer	0,55	0,6	0,33
3	MQ.03	h	NE 1000 higher ressure programmable single syringe pump	0,19	24	4,56
4	MQ.04	h	Servicio de microscopia F-SEM UPV	35,00	6	210,00
5	MQ.05	h	FR Series 300 Watt regulated high voltage DC power supplies	0,85	24	20,40
6	MQ.06	h	IKA Vortex Genius 3	0,10	0,6	0,06
7	MQ.09	h	t Technologies Cary 60 UV-Vis	0,28	24	6,72
8	MQ.11	h	Microtest SCM3000 95	0,25	5	1,25
9	MQ.14	h	Agitador magnético sin control de temperatura. Marca Ovan, modelo MMH50E	0,12	162	19,44
10	MQ.15	h	pH-metro	0,20	1,2	0,24
11	MQ.16	h	Liofilizadora	1,78	3	5,34
12	MQ.45	h	Desecador de la marca Vacuo-Temp	0,22	0,2	0,04
13	MQ.56	h	Discovery HR-2 Hybrid Rheometer	8,56	3	25,68
14	MQ.87	h	Bomba de vacio de la marca VACUM-10 Pa	0,19	0,2	0,04
Precio total maquinaria (€)						296,86

4. CUADRO MATERIALES

La tabla 20 muestra el cuadro de precios de los materiales empleados a lo largo del trabajo.

Tabla 20. Cuadro de precios de materiales empleados en el trabajo

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Precio (€)	Cantidad	Precio total (€)
1	E.01	ud	Gafas de protección	7,05	1	7,05
2	E.02	ud	Caja guantes de látex	5,85	3	17,55
3	E.03	ud	Mascara para partículas	4,11	1	4,11
4	E.04	ud	Máscara gases	30,20	1	30,20
5	E.05	ud	Bata de laboratorio	18,00	1	18,00
6	E.06	ud	Caja guantes de nitrilo	7,29	2	14,58
7	ML.01	ud	Estropajo	0,33	2	0,66
8	ML.02	L	Jabón	1,99	1	1,99
9	ML.03	ud	Rollo de papel	2,10	3	6,30
10	ML.04	L	Agua destilada obtenida bajo un sistema de ósmosis inversa	0,20	118	23,60
11	ML.05	L	Acetona de la casa comercial SCHARLAB	4,05	5,048	20,44
12	ML.06	L	Etanol de la casa comercial SCHARLAB	3,96	6	23,76
13	ML.07	L	Cloroformo de la casa comercial SCHARLAB	21,03	0,192	4,04
14	ML.08	g	Ácido poliláctico de la casa comercial NATUREWORKS	4,53	16,8	76,10
15	ML.09	g	Ácido hialurónico de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	27,63	0,72	19,89
16	ML.10	g	Clorhidrato de tetraciclina de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	8,56	1,06	9,07
17	ML.11	ud	Frasco ISO DE VOLUMEN 90 mL	5,89	4	23,56
18	ML.12	ud	Caja de puntas de micropipetas	64,54	6	387,24
19	ML.13	ud	Micropipeta 200 µL	230,00	1	230,00
20	ML.14	ud	Tubo falcon 30 mL	0,16	4	0,64
21	ML.15	ud	Micropipeta 1000µL	230,00	1	230,00

22	ML.16	ud	Vaso de precipitados de 250 mL	1,60	3	4,80
23	ML.17	ud	Cucharilla metálica con espátula	1,28	1	1,28
24	ML.18	ud	Jeringuilla	0,74	3	2,21
25	ML.19	ud	Aguja para jeringuilla	0,40	1	0,40
26	ML.20	g	Cloruro sódico de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	1,18	397,05	468,52
27	ML.21	g	MES de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	2,65	6,48	17,17
28	ML.22	g	Hidróxido de sodio de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	0,36	0,3	0,11
29	ML.23	g	Hidrocloruro de tiramina de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	14,30	0,222	3,17
30	ML.24	g	NHS de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	4,03	0,018	0,07
31	ML.25	g	EDC de la casa comercial IRIS-BIOTECH	43,90	0,282	12,38
32	ML.26	m	Membrana diálisis de la casa comercial SPECTRUM LABS	20,53	0,066	1,35
33	ML.28	ud	Tubo centrifuga 50 mL	1,60	6	9,60
34	ML.29	m	Teflón	79,25	0,024	1,90
35	ML.30	ud	Cinta adhesiva doble cara	2,60	1	2,60
36	ML.31	L	DBPS de la casa comercial GIBCO	34,98	0,53	18,54
37	ML.32	L	HRP de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	8,60	0,007	0,06
38	ML.33	mL	Peróxido de hidrógeno de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	7,17	0,32	2,29
39	ML.34	m	Hilo de cobre	56,32	0,25	14,08
40	ML.35	ud	Aguja quirúrgica	1,69	1	1,69
41	ML.86	ud	Eppendorf	0,08	190	15,20
42	ML.89	ud	Pie de rey	14,75	1	14,75
43	ML.91	ud	Cúter	3,00	1	3,00
44	ML.96	g	Azida de sodio de la casa comercial SIGMA-ALDRICH	6,86	1	6,86
Precio total materiales (€)						1750,81

5. CUADRO DE PRECIOS DESCOMPUESTOS

Para la realización del cuadro de precios se realizó la tabla 21. Para la simplificación de tabla y la posterior realización del presupuesto parcial se separó la tabla en capítulos y subcapítulos. Estos capítulos del presupuesto se estructuraron siguiendo los capítulos más importantes del procedimiento experimental del Trabajo Final de Grado.

Tabla 21. Cuadro de precios descompuestos

Nº Código	Descripción capítulo					
	1.Síntesis y caracterización HA-Tiramina					
1.1	Injerto de tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	10,000	h	13,50	135,00	
	Balanza analítica de precisión.	0,200	h	0,20	0,04	
	Agitador magnético.	27,000	h	0,12	3,24	
	pH-metro	0,200	h	0,20	0,04	
	Agua destilada	1,000	L	0,20	0,20	
	Ácido hialurónico	0,100	g	27,63	2,76	
	Cloruro sódico	0,175	g	1,18	0,21	
	MES	1,080	g	2,65	2,86	
	Hidróxido de sodio	0,050	g	0,36	0,02	
	Hidrocloreuro de tiramina	0,036	g	14,30	0,51	
	NHS	0,003	g	4,03	0,01	
	EDC	0,047	g	43,90	2,06	
	Medios auxiliares	3,000	%	146,95	4,41	
	Costes indirectos	3,000	%	151,36	4,54	
						155,90
1.2	Lavado del ácido hialurónico modificado con tiramina (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	6,000	h	13,50	81,00	
	Membrada de diálisis	0,011	m	20,53	0,23	
	Balanza analítica de precisión.	1,000	h	0,20	0,20	
	Agua destilada	15,000	L	0,20	3,00	
	Cloruro sódico	66,000	g	1,18	77,88	
	Medios auxiliares	3,000	%	162,31	4,87	
	Costes indirectos	3,000	%	167,18	5,02	
						172,20
1.3	Proceso de liofilización (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	0,500	h	13,50	6,75	
	Liofilizadora	0,500	h	0,89	0,89	

	Tubo centrifuga 50 mL	1,000	ud	1,60	1,60	
	Medios auxiliares	3,000	%	9,24	0,28	
	Costes indirectos	3,000	%	9,52	0,29	
						9,81
1.4	Determinación grado de sustitución (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Espectrofotómetro	1,000	h	0,28	0,28	
	Agua destilada	0,100	L	0,20	0,02	
	Hidrocloreuro de tiramina	0,001	g	14,30	0,01	
	Tubo eppendorf	8,000	ud	0,08	0,64	
	Medios auxiliares	3,000	%	0,95	0,02	
	3% Costes indirectos	3,000	%	0,98	0,03	
						1,00
2. Elaboración de membranas mediante <i>electrospinning</i> y caracterización						
2.1	Elaboración de una membrana sin emulsión (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	3,000	h	13,50	40,50	
	Balanza analítica de precisión.	0,100	h	0,20	0,02	
	Bomba	2,000	h	0,19	0,38	
	Fuente de alta tensión	2,000	h	0,85	1,70	
	Agua destilada	0,100	L	0,20	0,02	
	Acetona	0,004	L	4,05	0,02	
	Cloroformo	0,016	L	21,03	0,34	
	Ácido poliláctico	1,400	g	4,53	6,34	
	Medios auxiliares	3,000	%	49,32	1,48	
	Costes indirectos	3,000	%	50,80	1,52	
						52,32
2.2	Elaboración de una membrana con emulsión (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	4,000	h	13,50	54,00	
	Balanza analítica de precisión.	1,000	h	0,20	0,20	
	Sonicador	0,100	h	0,55	0,06	
	Bomba	2,000	h	0,19	0,38	
	Fuente de alta tensión	2,000	h	0,85	1,70	
	Vórtex	0,100	h	0,10	0,01	
	Agua destilada	0,100	L	0,20	0,02	
	Acetona	0,004	L	4,05	0,02	
	Cloroformo	0,016	L	21,03	0,34	
	Ácido poliláctico	1,400	g	4,53	6,34	
	Ácido hialurónico	0,020	g	27,63	0,55	
	Clorhidrato de tetraciclina	0,010	g	8,56	0,09	
	Medios auxiliares	3,000	%	63,71	1,27	

	Costes indirectos	3,000	%	64,98	1,95	
						66,93
2.3	Caracterización de las membranas (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	1,000	h	13,50	13,50	
	Servicio de microscopia F-SEM UPV	1,000	h	35,00	35,00	
	Medios auxiliares	3,000	%	48,50	1,46	
	3% Costes indirectos	3,000	%	49,96	1,50	
						51,46
3. Entrecruzamiento del hidrogel con las membranas						
3.1	Montaje de los soportes para el entrecruzamiento (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	0,800	h	13,50	10,80	
	Teflón	0,024	m	79,25	1,90	
	Cinta adhesiva doble cara	1,000	ud	2,60	2,60	
	Medios auxiliares	3,000	%	15,30	0,46	
	Costes indirectos	3,000	%	15,76	0,47	
						16,23
3.2	Preparación de la disolución HRP y H2O2 en DPBS (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	1,000	h	13,50	13,50	
	DBPS	0,100	L	34,98	3,50	
	HRP	0,001	L	8,60	0,01	
	Peróxido de hidrogeno	0,002	mL	7,17	0,01	
	Tubo eppendorf	4,000	ud	0,08	0,32	
	Medios auxiliares	3,000	%	17,34	0,52	
	Costes indirectos	3,000	%	17,86	0,54	
						18,40
3.3	Llenado de los poros de las membranas (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	0,200	h	13,50	2,70	
	Desecador	0,200	h	0,22	0,04	
	Bomba de vacío	0,200	h	0,19	0,04	
	DBPS	0,024	L	34,98	0,84	
	Tubo eppendorf	24,000	ud	0,08	1,92	
	Medios auxiliares	3,000	%	5,54	0,17	
	Costes indirectos	3,000	%	5,71	0,17	
						5,88
3.4	Entrecruzamiento del hidrogel (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	1,500	h	13,50	20,25	
	Medios auxiliares	3,000	%	20,25	0,61	

	Costes indirectos	3,000	%	20,86	0,63	
						21,49
4. Estudio de las propiedades						
4.1	Propiedades mecánicas (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	5,000	h	13,50	67,50	
	Microtest SCM3000 95	5,000	h	0,25	1,25	
	Hilo de cobre	0,250	m	56,32	14,08	
	Aguja quirúrgica	1,000	ud	1,69	1,69	
	Pie de rey	1,000	ud	14,75	14,75	
	Cúter	1,000	ud	3,00	3,00	
	Medios auxiliares	3,000	%	102,27	3,07	
	Costes indirectos	3,000	%	105,34	3,16	
						108,50
4.2	Estudio de liberación de fármacos (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	25,000	h	13,50	337,50	
	Espectrofotómetro	18,000	h	0,28	5,04	
	Agua destilada	0,200	L	0,20	0,04	
	Etanol	1,000	L	3,96	3,96	
	Clorhidrato de tetraciclina	1,000	g	8,56	8,56	
	DBPS	0,400	L	34,98	13,99	
	Tubo eppendorf	96,000	ud	0,08	7,68	
	Azida de sodio	1,000	g	6,86	6,86	
	Medios auxiliares	3,000	%	383,63	7,67	
	Costes indirectos	3,000	%	391,30	11,74	
						403,04
4.3	Caracterización hidrogel (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	0,700	h	13,50	9,45	
	Reómetro	0,500	h	8,56	4,28	
	DBPS	0,001	L	34,98	0,03	
	HRP	0,001	L	8,60	0,01	
	Peróxido de hidrogeno	0,053	mL	7,17	0,38	
	Tubo eppendorf	3,000	ud	0,08	0,24	
	Medios auxiliares	3,000	%	14,39	0,43	
	Costes indirectos	3,000	%	14,82	0,44	
						15,26
5. Equipos de protección individual y seguridad						
5.1	EPI'S (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Gafas de protección	1,000	ud	7,05	7,05	

	Caja guantes de látex	3,000	ud	5,85	17,55	
	Mascara para partículas	1,000	ud	4,11	4,11	
	Máscara gases	1,000	ud	30,20	30,20	
	Bata de laboratorio	1,000	ud	18,00	18,00	
	Caja guantes de nitrilo	2,000	ud	7,29	14,58	
	Costes indirectos	3,000	%	91,49	2,74	
						94,23
6. Material inventariable						
6.1	Material inventariable (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	FRASCO PIREX 90 mL	4,000	ud	5,89	23,56	
	Caja de puntas de micropipetas	6,000	ud	64,54	387,24	
	Micropipeta 200 µL	1,000	ud	230,00	230,00	
	Tubo falcon de 30 mL	4,000	ud	0,16	0,64	
	Micropipeta 1000µL	1,000	ud	230,00	230,00	
	Vaso de precipitados de 250 mL	3,000	ud	1,60	4,80	
	Cucharilla metálica	1,000	ud	1,28	1,28	
	Jeringuilla	3,000	ud	0,74	2,21	
	Aguja para jeringuilla	1,000	ud	0,40	0,40	
	Costes indirectos	3,000	%	880,13	26,40	
						906,53
7. Limpieza del material						
7.1	Limpieza material de laboratorio (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	5,000	h	13,50	67,50	
	Estropajo	2,000	ud	0,33	0,66	
	Jabón	1,000	L	1,99	1,99	
	Rollo de papel	3,000	ud	2,10	6,30	
	Agua destilada	20,000	L	0,20	4,00	
	Acetona	5,000	L	4,05	20,25	
	Etanol	5,000	L	3,96	19,80	
	Medios auxiliares	3,000	%	120,50	2,41	
	Costes indirectos	3,000	%	122,91	3,69	
						126,60
8. Reuniones						
8.1	Reuniones de planificación y gestión (ud)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	19,000	h	13,50	256,50	
	Director responsable del proyecto	25,000	h	24,00	600,00	
	Co-director responsable del proyecto	25,000	h	19,50	487,50	
	Técnico de laboratorio	5,000	h	12,50	62,50	

	Medios auxiliares	2,000	%	1406,50	28,13	
	Costes indirectos	3,000	%	1434,63	43,04	
						1.477,67
8.2	Reuniones de seguimiento y control (h)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	19,000	h	13,50	256,50	
	Director responsable del proyecto	22,000	h	24,00	528,00	
	Co-director responsable del proyecto	45,000	h	19,50	877,50	
	Medios auxiliares	2,000	%	1662,00	33,24	
	Costes indirectos	3,000	%	1695,24	50,86	
						1.746,10
8.3	Revisiones y correcciones (h)	Cantidad	Unidad	Precio unidad (€/u)	Precio Parcial (€)	Precio total (€)
	Graduado en ingeniería química	72,30	h	13,50	976,05	
	Medios auxiliares	2,000	%	976,05	19,52	
	Costes indirectos	3,000	%	995,57	29,87	
						1.025,44

6. PRESUPUESTOS PARCIALES

En la siguiente tabla 22 se muestran los presupuestos parciales de cada capítulo.

Tabla 22. Tabla de presupuestos parciales de cada capítulo del presupuesto

Nº Código	Descripción capítulo				
1	1. Síntesis y caracterización HA-Tiramina (ud)				
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
1.1	Injerto de tiramina	ud	6	155,90	935,40
1.2	Lavado del ácido hialurónico modificado con tiramina	ud	6	172,20	1033,20
1.3	Proceso de liofilización	ud	6	9,81	58,86
1.4	Determinación grado de sustitución	ud	6	1,00	6,00
Presupuesto parcial capítulo 1					2.033,46
2	2. Elaboración de membranas mediante <i>electrospinning</i> y caracterización (ud)				
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
2.1	Elaboración de una membrana sin emulsión	ud	6	52,32	313,92
2.2	Elaboración de una membrana con emulsión	ud	6	66,93	401,58
2.3	Caracterización de las membranas	ud	6	51,46	308,76
Presupuesto parcial capítulo 2					1.024,26

3. Entrecruzamiento del hidrogel con las membranas (ud)					
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
3.1	Montaje de los soportes para el entrecruzamiento	ud	1	16,23	16,23
3.2	Preparación de la disolución HRP y H2O2 en DPBS	ud	1	18,40	18,40
3.3	Llenado de los poros de las membranas	ud	1	5,88	5,88
3.4	Entrecruzamiento del hidrogel	ud	1	21,49	21,49
Presupuesto parcial capítulo 3					62,00
4. Estudio de las propiedades (ud)					
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
4.1	Propiedades mecánicas	ud	1	108,50	108,50
4.2	Estudio de liberación de fármacos	ud	1	403,04	403,04
4.3	Caracterización hidrogel	ud	6	15,26	91,56
Presupuesto parcial capítulo 4					603,10
5. Equipos de protección individual y seguridad (ud)					
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
5.1	EPI'S	ud	1	94,23	94,23
Presupuesto parcial capítulo 5					94,23
6. Material inventariable (ud)					
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
6.1	Material inventariable	ud	1	906,53	906,53
Presupuesto parcial capítulo 6					906,53
7. Limpieza del material (ud)					
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
7.1	Limpieza material de laboratorio	ud	1	126,60	126,60
Presupuesto parcial capítulo 7					126,60
8. Reuniones (ud)					
	Descripción	Ud	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
8.1	Reuniones de planificación y gestión	ud	1	1.477,67	1.477,67
8.2	Reuniones de seguimiento y control	ud	1	1.746,10	1.746,10
8.3	Revisiones y correcciones	ud	1	1.025,44	1.025,44
Presupuesto parcial capítulo 8					4.249,21

7. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN

En primer lugar se obtiene el presupuesto de ejecución material como suma de los presupuestos parciales. El presupuesto de ejecución por contrata se obtiene como la suma del presupuesto de ejecución material y los gastos generales aplicables a este presupuesto (13% del presupuesto de ejecución material). Por último, para obtener el presupuesto base de licitación se aplicó el IVA (21%) a este último presupuesto obtenido.

Presupuesto de ejecución material, por contrata y base de licitación.

1 Síntesis y caracterización HA-tiramina	2.033,46
2 Elaboración de membranas mediante <i>electrospinning</i> y caracterización	1.024,26
3 Entrecruzamiento del hidrogel con las membranas	62,00
4 Estudio de las propiedades	603,10
5 Equipos de protección individual y seguridad	94,23
6 Material inventariable	906,53
7 Limpieza del material	126,60
8 Reuniones	4.249,21
Total.....:	9.099,39 €

Asciende el presupuesto de ejecución material a la expresada cantidad de **NUEVE MIL NOVENTA Y NUEVE EUROS CON TREINTA Y NUEVE CÉNTIMOS.**

Presupuesto de ejecución material	9.099,39 €
Gastos generales 13%	1.182,92
Beneficio industrial 0%	0,0
Presupuesto ejecución por contrata	10.282,31 €

Asciende el presupuesto de ejecución por contrata a la expresada cantidad de **DIEZ MIL DOSCIENTOS OCHENTA Y DOS EUROS CON TRENTA Y UN CÉNTIMOS.**

Presupuesto de ejecución por contrata	10.282,31 €
IVA 21%	2.159,29
Presupuesto base de licitación	12.441,60 €

Asciende el presupuesto base de licitación a la expresada cantidad de **DOCE MIL CUATROCIENTOS CUARENTA Y UN EUROS CON SESENTA CÉNTIMOS.**