



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Curso Académico:

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi tutora, Ana Vallés, y a mi co-tutor, Guillermo Vilariño, el haberme brindado la oportunidad de poder realizar este trabajo juntos y todo el esfuerzo que han dedicado desde el primer hasta el último instante. A todos los docentes de esta escuela, en mayor o menor medida, agradecerles la contribución en el aprendizaje de todos los conocimientos adquiridos a lo largo de la titulación. A mi compañera de laboratorio, Alba, por toda la ayuda prestada, y volviendo unos años hacia atrás, quiero agradecerle a mi profesor de clases particulares, José Carlos, todas las indicaciones que hicieron que tomara el camino hasta aquí.

A mis amigos y compañeros Javier Durá, Carlos Galan, Celia Lopez, y Javier Simó darles las gracias por todos los momentos y apuntes que hemos compartido durante estos cuatro años. A mis amigos y compañeros de piso, Tono y Cristian, por aportarme ese granito de arena constante que me ha hecho mejorar día a día.

Pero sobretodo quiero agradecerles a mis padres, y en especial a mi abuela, todo el apoyo y esfuerzo que han invertido para que pueda hacer realidad este trabajo.

RESÚMENES

RESUMEN

Título

Desarrollo de soportes porosos basados en poliglicerol sebacato de aplicación en la regeneración asistida de tejido vascular dañado, mediante técnicas de separación de fases.

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de muerte en el mundo y estas tienen asociados problemas como la aterosclerosis y la hipertensión arterial. Para combatir estos problemas existen en la actualidad alternativas como los trasplantes que se ven limitadas por la baja disponibilidad y por una cierta probabilidad de rechazo por parte del paciente, o las prótesis vasculares, que no funcionan bien en diámetros pequeños por trombogenicidad. Como alternativa se presenta la ingeniería tisular con el fin de dar sustento a estos problemas, ya que no presenta estas limitaciones y además se puede amoldar a la necesidad de cada persona. Por ello, en este Trabajo Fin de Grado se pretende desarrollar procedimientos para la síntesis de materiales porosos de poliglicerol sebacato, PGS, con poros de la forma, dimensiones e interconectividad tales que puedan ser de utilidad en el ámbito de la ingeniería tisular, en concreto para la sustitución de vasos sanguíneos dañados. Se busca también, pues, que estos presenten una adecuada elasticidad y resistencia mecánica, y puedan ser invadidos por células endoteliales o intersticiales de forma viable.

Los procedimientos se basan en la separación de fases entre el polímero y el disolvente empleado durante el curado del primero, o bien se llevará a cabo el curado en presencia de un porógeno que actuará como plantilla. A continuación, en cualquiera de los casos, deberá eliminarse el porógeno empleado, por lavado en un disolvente afín, con el fin de obtener el andamiaje poroso con las características de tamaños de poro del orden de 100 μm , porosidad de 70/80 %, con interconectividad y paredes redondeadas. Para ello, se ha analizado la influencia de la naturaleza del disolvente y su proporción en la mezcla sobre la morfología final de los soportes (microscopía electrónica de barrido, determinación de la porosidad) y características fisicoquímicas (densidad) y mecánicas (ensayos a compresión) de los mismos.

Palabras clave

poliglicerol sebacato, ingeniería tisular, polimerización por condensación, separación de fases, regeneración de tejido vascular.

RESUM

Títol

Desenvolupament de suports porosos basats en poliglicerol sebacat d'aplicació per a la regeneració assistida de teixit vascular danyat, mitjançant tècniques de separació de fases.

Resum

Les malalties cardiovasculars són les principals causes de mort en el món i aquestes tenen associades problemes com l'aterosclerosi i hipertensió arterial. Per a combatre aquests problemes existeixen en l'actualitat alternatives com els trasplantaments, que es veuen limitats per la baixa disponibilitat i per una certa probabilitat de rebuig per part del pacient. Com a alternativa es presenta l'enginyeria tissular amb la finalitat de donar sustent a aquests problemes, ja que no presenta aquestes limitacions i, a més, es pot adaptar a la necessitat de cada persona. Per això, en aquest Treball Fi de Grau es pretén desenvolupar procediments per a la síntesi de materials porosos de poliglicerol sebacat, PGS, amb porus de la forma, dimensions i interconnectivitat tals que puguen ser d'utilitat en l'àmbit de l'enginyeria tissular, en concret per a la substitució de vasos sanguinis danyats. Es cerca també, que aquests presenten una adequada elasticitat i resistència mecànica, i puguen ser envaïts per cèl·lules endotelials o intersticials de forma viable.

Aquests procediments es basen en la separació de fases entre el polímer i el dissolvent utilitzat durant el guarit del primer, o bé en dur a terme el guarit en presència d'un porògen que actuarà com a plantilla. A continuació, en qualsevol dels casos, haurà d'eliminar-se el porògen emprat, llavant-lo amb un dissolvent afí, amb la finalitat d'obtenir l'andamiatge porós amb característiques de grandària de porus del ordre de 100 μm , porositat de 70/80 %, amb interconnectivitat i parets arrodonides. S'analitza la influència de la naturalesa del dissolvent i la seua proporció en la mescla sobre la morfologia final dels suports (microscopía electrònica d'escombratge, determinació de la porositat) i les característiques fisicoquímiques (densitat) i mecàniques (assajos a compressió) dels mateixos.

Paraules clau

poliglicerol sebacat, enginyeria tissular, polimerització per condensació, separació de fases, regeneració de teixit vascular.

ABSTRACT

Title

Development of porous supports by poly (glycerol sebacate) based on the assisted regeneration application of vascular damaged tissue by phase separation techniques.

Abstract

Cardiovascular diseases are the main death cause in the world and they have associated problems as atherosclerosis and arterial hypertension. To face these problems, there exist alternatives as the transplants, but they are limited because of the low availability and the chance of being rejected by the patient, and vascular prostheses, which fail at small diameters because of their thrombogenicity. Alternatively, the tissue engineering, has the purpose of solving this problems, because it doesn't present these drawbacks and furthermore, it can be adapted to each people needs. Therefore, the aim of this Final Degree Thesis is to develop the process for the synthesis of porous materials made out of poly(glycerol sebacate), PGS, with pores such that their form, dimensions and interconnectivity it can be suitable for tissue engineering, more concretely, these biomaterials are intended for the of damaged blood vessels replacement. Thus, it's sought, that these scaffolds present a proper elasticity and mechanical resistance, and they to be invaded freely with endothelial or interstitial cells.

This process is based upon the polymer-solvent phase separation technique during polymer curing, or upon curing the polymer in the presence of a template that will act as a porogen. Next, in both cases, deleted the porogen will be dissolved by washing it in an affine solvent, in order to obtain the porous structure, with characteristics like pore sizes on the order of 100 μm , porosity of 70/80 %, interconnectivity and rounded walls. The effect of the solvent nature and its rate in the mixture is analysed over the morphology of the resulting scaffolds (scanning electron microscopy, porosity), and their physicochemical (density, swelling in aqueous medium) and mechanical performance (compression tests).

Key words

Poly (glycerol sebacate), tissue engineering, polymerization by condensation, phases separation, vascular tissue regeneration.

DOCUMENTOS CONTENIDOS

- Memoria
- Presupuesto
- Anexos

MEMORIA

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. INGENIERÍA TISULAR	3
2.2. BIOMATERIALES EN MEDICINA	5
2.3. BIOMATERIALES EN INGENIERÍA TISULAR	6
2.4. SCAFFOLDS COMO SOPORTE EN INGENIERIA TISULAR	7
2.5. REGENERACIÓN DE TEJIDO VASCULAR EN INGENIERÍA TISULAR.....	11
2.6. POLIGLICEROL SEBACATO COMO BIOMATERIAL EN INGENIERÍA TISULAR	13
2.7. MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN	16
3. NORMATIVA	17
3.1. GESTIÓN DE RESIDUOS DE PRODUCTOS QUÍMICOS EN LA UPV	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1. REACTIVOS, PORÓGENOS Y OTRAS SUSTANCIAS	19
4.2. UTENSILIOS Y MATERIAL DE LABORATORIO	20
4.3. EQUIPOS Y ACCESORIOS.....	20
4.4. MONTAJE	21
4.4.1. Montaje para el protocolo de prepolimerización	21
4.4.2. Montaje para el protocolo de curado	22
4.4.3. Montaje para el lavado de <i>scaffolds</i>	23
4.4.4. Montaje para el ensayo de microscopia electrónica de barrido	23
4.4.5. Montaje para el ensayo de densidad y porosidad	24
4.4.6. Montaje para el ensayo mecánico de compresión	24
4.4.7. Montaje para el análisis químico de cromatografía de gases.....	25
4.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.5.1. Protocolo estándar para la fase de prepolimerización de PGS.....	26
4.5.2. Protocolo optimizado para la fase de prepolimerización de PGS.....	27
4.5.3. Protocolo de curado de PGS.....	28
4.5.4. Protocolo de lavado y secado de <i>scaffolds</i> de PGS	36
4.5.5. Ensayos de caracterización de <i>scaffolds</i> de PGS	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN.....	51
5.1.1 RESULTADOS DEL ENSAYO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	51
5.1.2. ENSAYO DE DENSIDAD Y POROSIDAD.....	57
5.1.3. ENSAYO MECÁNICO DE COMPRESIÓN PARA EL ANÁLISIS DE MODULO ELÁSTICO.....	58
6. CONCLUSIONES	62
7. PERSPECTIVAS DE FUTURO	64
8. BIBLIOGRAFIA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pilares de la Ingeniería Tisular. Adaptada de (Murphy et al., 2013)	4
Figura 2. Reparación dental mediante aleación metálica (Knut, 2014).	5
Figura 3. Prótesis articular de cadera (Albornoz, 2014).	5
Figura 4. Ilustración esquemática de los aspectos relacionados con la biocompatibilidad de un biomaterial y propiedades que ha de cumplir en función del medio en que se va a usar. Adaptada de (Park y Lakes, 2007).	7
Figura 5. Efectos hidrodinámicos de los vasos sanguíneos. Adaptada de (Schutte y Nerem, 2013).	11
Figura 6. Reacción química de síntesis del poliglicerol sebacato. Adaptada de (Loh <i>et al.</i> , 2015).	14
Figura 7. Esquema detallado del proceso de policondensación de PGS. Adaptada (Maliger <i>et al.</i> , 2013)	15
Figura 8. Montaje experimental para el protocolo estándar.	21
Figura 9. Montaje experimental para el protocolo optimizado.	21
Figura 10. Detalle de la trampa de nitrógeno.	22
Figura 11. Detalle del montaje del baño termostático.	22
Figura 12. Molde para el curado de <i>films</i> de PGS. A) Molde montado anclado con pinzas metálicas. B) Molde de cristal forrado de plástico adhesivo y molde de teflón.	22
Figura 13. Horno para el curado del prepolímero de PGS.	22
Figura 14. Montaje para el lavado de <i>scaffolds</i>	23
Figura 15. Bomba para circuito de refrigeración.	23
Figura 16. Microscopio electrónico de barrido JSM-5410.	23
Figura 17. Balanza de precisión montada con el kit de ensayo de densidad.	24
Figura 18. Desecador a vacío y bomba de vacío.	24
Figura 19. Analizador termomecánico Seiko TMA/SS6000.	24
Figura 20. Detalle del vástago del analizador.	24
Figura 21. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A.	25
Figura 22. Portamuestras en detalle del cromatógrafo Agilent Technologies 7820A.	25
Figura 23. Diagrama de bloques del proceso completo.	26
Figura 24. Naturaleza de las sustancias porogénicas empleadas.	29
Figura 25. Portamuestras cilíndricos con las muestras tratadas con oro colocadas en los laterales, para poder observar su sección.	38
Figura 26. Estática de fluidos de un cuerpo sumergido en un fluido.	38

Figura 27. <i>Scaffolds</i> con los poros A) vacíos y B) llenos de fluido.	39
Figura 28. <i>Film</i> fabricado por el protocolo A) estándar y B) optimizado.	42
Figura 29. Viales de la experiencia con A) mezcla PGS/DMF y B) DMF pura de la experiencia 2 tras el curado.	43
Figura 30. Gráficos cromatográficos de la muestra de A) DMF pura sin proceso de curado, B) DMF pura tras el proceso de curado.	43
Figura 31. Muestra de mezcla entre naftaleno y PGS para la técnica de separación de fases con porosidad estimada de 80 %.	44
Figura 32. Muestra de la experiencia de naftaleno con n-octano y PGS para la técnica de separación de fases con porosidad estimada de 80 %.	45
Figura 33. Muestra de la experiencia con frasco hermético de PGS y parafina.	46
Figura 34. Viales en detalle de PGS curado en presencia de parafina.	46
Figura 35. Muestras de la A) experiencia 2. B) experiencia 3 y C) experiencia 4, de PGS con parafina como porógeno.	46
Figura 36. A) Réplica 1 de F127. B) Réplica 1 de la experiencia 1 de P123. C) Replica 1 de la experiencia 2, PGS con F127 y P123 como porógenos.	47
Figura 37. A) Réplica 1 de la experiencia 1. B) Réplica 2 de la experiencia 2, PGS con PEO como porógeno.	47
Figura 38. Réplica A) de la experiencia 1, B) de la experiencia 3, C) de la experiencia 4 y D) de la experiencia 2 de fabricación de <i>scaffolds</i> con PEMA.	48
Figura 39. Réplica E) de la experiencia 5 y F) de la experiencia 6 de fabricación de <i>scaffolds</i> con PEMA.	48
Figura 40. Réplica A) de la experiencia 1, B) de la experiencia 3 y C) de la experiencia 2 de fabricación de <i>scaffolds</i> con PMMA.	49
Figura 41. Muestras de la experiencia 2 con PMMA tras el proceso de lavado.	49
Figura 42. Réplica D) de la experiencia 4 y E) de la experiencia 6 de fabricación de <i>scaffolds</i> con PMMA.	49
Figura 43. Réplicas de la experiencia 6 tras el proceso de lavado.	50
Figura 44. Réplica de la experiencia 4 tras 24 horas del proceso de lavado.	50
Figura 45. Porción del <i>scaffold</i> de PGS obtenido por plantilla porogénica de PVA.	50
Figura 46. Fotografía del SEM con 50x del <i>scaffold</i> obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte con cuchilla.	52
Figura 47. Fotografías del SEM con A) 200x y B) 500x al <i>scaffold</i> obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte con cuchilla.	52

Figura 48. Fotografía del SEM con 50x al <i>scaffold</i> obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte en frío.	53
Figura 49. Fotografía del SEM con A) 200x y B) 500x al <i>scaffold</i> obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte en frío. Barras de escala 300 μm (A) y 100 μm (B).	54
Figura 50. Fotografía del SEM con A) 50x y B) 500x del <i>scaffold</i> obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (70/30) y corte con cuchilla.	55
Figura 51. Fotografías del SEM con A) 500x y B) 50X del <i>scaffold</i> obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (70/30) y corte en frío.	55
Figura 52. Fotografías del SEM de la A) región izquierda y B) región derecha del <i>scaffold</i> obtenido con plantilla porogénica, relación de THF (70/30) y corte con cuchilla.	56
Figura 53. Gráfico tensión-deformación unitaria comparativo de las muestras (<i>film</i> y <i>scaffolds</i>) fabricadas mediante el protocolo optimizado.	59
Figura 54. Gráfico comparativo del ajuste de los datos obtenidos para el cálculo del módulo de Young a bajas deformaciones de los <i>scaffolds</i>	59
Figura 55. Gráfico tensión-deformación unitaria comparativo de los <i>films</i> fabricados por el protocolo estándar y optimizado.	60
Figura 56. Gráfico con ajuste de los datos obtenidos para el cálculo del módulo de Young a bajas deformaciones de los <i>filmsO</i> y <i>filmsE</i>	60
Figura 57. Gráfico con ajuste de los datos obtenidos para el cálculo del módulo de Young a altas deformaciones de los <i>filmsO</i> y <i>filmsE</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de fabricación de <i>scaffolds</i> . Adaptada (Dalton y Woodfi, 2008)	10
Tabla 2. Ejemplos de materiales sintéticos propuestos en ingeniería tisular vascular. Adaptada de (Schutte y Nerem, 2013).	12
Tabla 3. Reactivos para la síntesis de PGS.....	19
Tabla 4. Porógenos utilizados para la fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS.....	19
Tabla 5. Sustancias utilizadas para el proceso de síntesis de PGS.....	20
Tabla 6. Datos teóricos para la separación de fases mediante porógeno tipo 1.	31
Tabla 7. Datos teóricos para la separación de fases mediante porógeno tipo 2.	32
Tabla 8. Datos teóricos para la separación de fases mediante porógeno tipo 3.	33
Tabla 9. Datos teóricos para la separación de fases mediante PCL, porógeno tipo 4.	34
Tabla 10. Datos teóricos para la separación de fases mediante P123, F127 y PEO, porógenos tipo 4...34	
Tabla 11. Experiencias para <i>particulate leaching</i> con PMMA y PEMA, porógenos tipo 4.	35
Tabla 12. Datos teóricos para <i>particulate leaching</i> con PMMA y PEMA, porógenos tipo 4.	35
Tabla 13. Densidades experimentales y medias obtenidas del ensayo de densidad.	57

1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es el estudio del procedimiento de síntesis del poliglicerol sebacato, PGS, con el fin de obtener un biomaterial poroso para su uso en ingeniería tisular en aplicaciones de sustitución de vasos sanguíneos dañados. Este proceso de síntesis se divide en fase de prepolimerización y fase de curado, de las cuales emanan objetivos secundarios y de igual importancia como:

- La optimización del protocolo de prepolimerización discontinua del PGS con el fin de conseguir un incremento de la producción de este.
- La modificación y desarrollo del proceso de curado para conseguir que el prepolímero cure en presencia de diferentes sustancias que actúen como porógeno basándose en la técnica de la separación de fases durante el curado o de curado en presencia de un porógeno (*particulate leaching*) y, por tanto,
- obtener la relación de polímero-porógeno necesaria para conseguir la suficiente interconectividad entre los poros formados, que estos adopten un tamaño del orden decimas de milímetro y el andamiaje final tenga un porcentaje de porosidad entre 60 % y 80 % y, así,
- estudiar las propiedades estructurales, físico-químicas y mecánicas de los materiales porosos obtenidos, mediante el uso de ensayos de caracterización adecuados para cada caso.

Una vez efectuados los ensayos de caracterización se evaluarán los resultados obtenidos, así como las decisiones tomadas a lo largo del trabajo, para dar lugar a unas conclusiones razonadas y que determinen si se han cumplido los objetivos marcados.

Simultáneamente, se pretende conseguir los siguientes objetivos académicos:

- Consolidar y aplicar conocimientos que se han ido adquiriendo durante el transcurso del Grado en Ingeniería Química, en particular conocimientos como termoquímica, transmisión de calor, cinética química, mecánica de fluidos y biopolímeros.
- Adquirir y afianzar competencias en la búsqueda de información de antecedentes del trabajo, así como las propiedades y fichas de seguridad de los reactivos y sustancias peligrosas que se manipulan para tener prudencia de los riesgos que estos pueden ocasionar.
- Mejorar la toma de decisiones en la organización y planificación de las tareas que se van realizar, innovando en posibles alternativas en la metodología de trabajo con el fin de conseguir los objetivos marcados con éxito y en el plazo estipulado.

2. ANTECEDENTES

En la actualidad, los problemas más graves y costosos para la población, tanto de salud como económicos, son los atribuidos a la pérdida, parcial o total, de la función de un órgano o tejido. Ofrecer tratamiento a estos problemas ha sido uno de los principales focos de estudio e investigación, siendo las prótesis, trasplantes e injertos autólogos y la regeneración tisular los principales procedimientos básicos (Falke y Anthony, 2000).

Las soluciones protésicas artificiales y mecánicas tradicionales han conseguido alargar e incluso mejorar la vida de la inmensa mayoría de los pacientes. A pesar de ello, no son capaces de realizar todas las funciones de un solo órgano y ofrecen una solución temporal debido a diversos problemas como rechazo al material, fallos mecánicos a lo largo de su vida útil, daños al tejido sano circundante como consecuencia de una respuesta inmune e incluso problemas quirúrgicos y postoperatorios como infecciones y desarrollo de tumores malignos (Langer, 1993).

La cirugía basada en la reconstrucción y el trasplante de órganos, a pesar del aumento del número de trasplantes de órganos, se ve muy limitada de forma habitual debido a una baja disponibilidad de donantes y grandes listas de espera, por lo que cada año fallecen un gran número de pacientes esperando el adecuado a su necesidad (Orive *et al.*, 2003).

Debido al inminente aumento de las necesidades de órganos sanos o uso de prótesis, junto con los avances conseguidos en la última década por disciplinas como la biología, la biotecnología y la genética, se ha agudizado la búsqueda de novedosas soluciones e impulsado el interés de la comunidad científica por innovar en nuevas alternativas. Todo ello ha convergido en la emergencia de la ingeniería tisular, consiguiendo una realidad clínica de lo que parecía ciencia ficción (Orive *et al.*, 2003).

2.1. INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería tisular es un área científica interdisciplinar que abarca los principios de la ingeniería y los fundamentos de las ciencias de la vida. La ingeniería desempeña el papel fundamental de proporcionar los conocimientos necesarios para el diseño, desarrollo y análisis de los materiales. Conocimientos aplicados a la fabricación de implantes a medida con polímeros que proporcionan las propiedades requeridas para su correcto funcionamiento. Asimismo, este nuevo campo interdisciplinar se ocupa del desarrollo de aplicaciones biológicas mediante células vivas y matrices extracelulares sintéticas o biodegradables. Con el fin de crear sustitutos biológicos para la implantación en el cuerpo humano, se combinan de forma armoniosa materiales y componentes celulares utilizados con el objeto de que los tratamientos específicos mantengan, restauren e incluso mejoren alguna función del organismo garantizando el éxito terapéutico (Falke y Anthony, 2000).

Con el objetivo de conseguir satisfacer la necesidad de crear sustitutos biológicos, como se observa en la Figura 1, la ingeniería tisular se fundamenta en tres pilares base (Murphy *et al.*, 2013):

- células, como base para la formación del tejido necesario,
- señales biológicas, como estímulos bioquímicos o factores de crecimiento que impulsarán la diferenciación y crecimiento de las células y
- soporte poroso o biomaterial que aporta la estructura donde se alojarán las células y señales biológicas para el desarrollo y crecimiento del tejido.

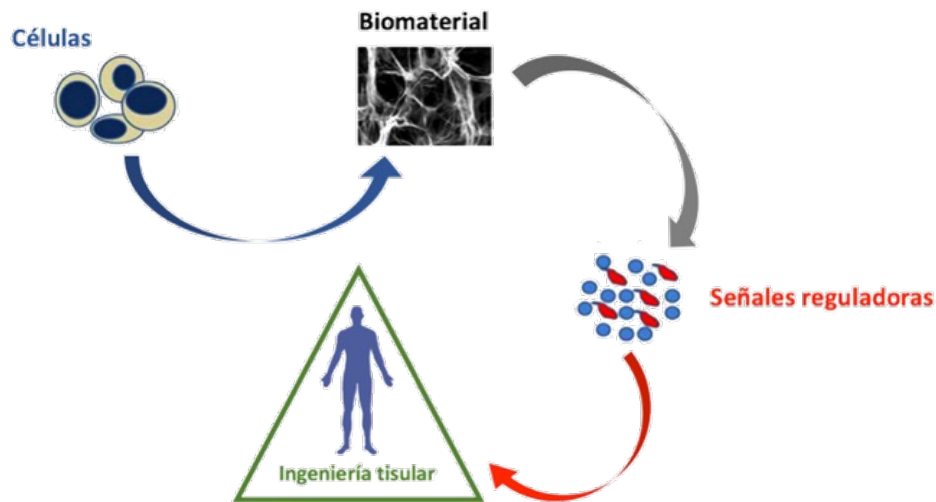


Figura 1. Pilares de la Ingeniería Tisular. Adaptada de (Murphy et al., 2013)

Las líneas celulares varían según la naturaleza y características. Deben ser identificadas, aisladas y tener fácil multiplicación para satisfacer la demanda. Se pueden diferenciar entre:

- autólogas, son las más adecuadas para ser administradas por conseguir evitar el riesgo a rechazo inmunológico por ser células de la propia persona. Por contra, en muchos casos obtenerlas es una tarea cuasi imposible,
- células de otros pacientes u otras especies (alógenas y xenogénicas, respectivamente) son usadas cuando resulta imposible extraerlas del propio individuo; se requiere una reducción máxima de la antigenicidad y extremar la bioseguridad para evitar cualquier infección, y
- células madre autólogas (embrionarias o adultas) o alógenas, que ofrecen múltiples aplicaciones terapéuticas pero con varias limitaciones como comprender el proceso de diferenciación celular (Cecilia Fabres V., 2010).

A pesar de todo, a día de hoy todavía existen algunas barreras por superar, como la búsqueda de marcadores de células específicos para identificar la línea celular de forma correcta, la mejora de la expansión celular *in vitro* con el desarrollo de nuevos medios celulares y realizar modelos experimentales que demuestren la funcionalidad de estas (Orive *et al.*, 2003).

Para dirigir la formación de tejido, junto con las líneas celulares, se suelen incorporar componentes bioactivos o señales biológicas, que incluyen estímulos bioquímicos y biofísicos para inducir y regular el desarrollo del tejido (Murphy *et al.*, 2013).

Entre las señales biológicas que se suelen incorporar, se encuentran biomoléculas solubles como las moléculas peptídicas, proteínas y factores de crecimiento, que están incluidas como señales biológicas y tienen la función de modular la respuesta celular para que el conjunto consiga imitar la de la matriz extracelular (MEC), además de ser potencialmente terapéuticas, y los ligandos insolubles que naturalmente se encuentran en la MEC. Una prometedora estrategia para suministrar este tipo de proteínas inactivas es el uso del trasplante de células que por sí mismas secretan los factores de crecimiento deseados. La clave del éxito de la ingeniería tisular puede residir en estos factores (Boontheekul y Mooney, 2003).

Se denominan soportes o andamios (a partir de ahora por su nombre en inglés, *scaffold*) a los constructos realizados a partir de biomateriales que realizan un papel fundamental dentro de la ingeniería tisular proporcionando a las células la estructura biomecánica con el objetivo de imitar las condiciones y características de la MEC, y actuando como un componente capaz de ser trasplantado, permitiendo y facilitando la generación del tejido funcional producido por las células y señales hasta conseguir una adecuada MEC similar a la original (González-Jiménez et al., 2014).

2.2. BIOMATERIALES EN MEDICINA

La utilización de materiales en medicina se remonta al antiguo Egipto y civilizaciones clásicas, donde se hacía uso de metales y otros productos naturales. En el siglo XVI, en Europa se empleaban la plata y el oro para reparaciones dentales. Posteriormente, a lo largo del siglo XIX se buscó mejorar las propiedades mecánicas y la resistencia a la corrosión desarrollando nuevas aleaciones. En la Figura 2 se muestra una reparación dental con una aleación metálica que todavía se utilizan en la actualidad.

Ya en el siglo XX y con la aceleración del desarrollo de los materiales poliméricos, se consiguió el descubrimiento de materiales para la fabricación de hilos de sutura con las capacidades de degradación y absorción por el organismo sin generar una reacción negativa por éste. Este avance fomentó, junto con la necesidad de rehabilitar a los inválidos de la Segunda Guerra Mundial, una investigación sobre los materiales absorbibles y tolerables por el organismo para la fabricación de implantes y prótesis, Figura 3 (Lizarbe, 2007)..

Los avances conseguidos en otros ámbitos han complementado este desarrollo con una disminución del riesgo de infecciones, debido al conocimiento, identificación y uso de antibióticos y, sobre todo, los procesos biológicos que se desencadenan cuando entran en contacto el material y la materia viva (Lizarbe, 2007).

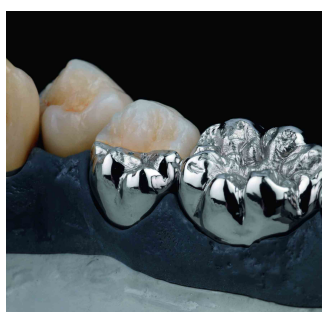


Figura 2. Reparación dental mediante aleación metálica (Knut, 2014).



Figura 3. Prótesis articular de cadera (Albornoz, 2014).

Este tipo de materiales han ido evolucionando hasta definir el término "biomaterial" como "una sustancia que ha sido diseñada para tener una configuración que, por sí misma o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, a través del control de las interacciones con los diferentes componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico" (Ratner y Bryant, 2004).

A partir de los años 50 y 70 comenzaron a evaluarse características de los biomateriales como la implantación a largo plazo, toxicidad y respuesta inflamatoria. Los primeros estudios sobre las lesiones que estos podían ocasionar fueron publicados en la década de los 60 (Lizarbe, 2007), momento en el

que se introdujo el término de biocompatibilidad como “la aceptación de un implante artificial por los tejidos circundantes y por el cuerpo en su conjunto. El biomaterial no debe ser degradado por el medio biológico del cuerpo, y su presencia no debe dañar tejidos, órganos o sistemas. Si el biomaterial está diseñado para degradarse, los productos de degradación no deben dañar los tejidos y órganos” (Park y Lakes, 2007).

En el periodo restante hasta principios del siglo XXI, los estudios se centraron en conocer de forma exhaustiva las interacciones biológicas entre tejido y biomaterial. En la última década, con el desarrollo de áreas como la Biología Molecular y la Ingeniería Tisular (Lizarbe, 2007) el número de materiales poliméricos usados ha experimentado un enorme aumento que ha ido ligado al desarrollo de varias tecnologías que, a priori, no estaban relacionadas, como son la nanotecnología, la liberación de fármacos y otras (Kohane y Langer, 2008).

2.3. BIOMATERIALES EN INGENIERÍA TISULAR

Los biomateriales en ingeniería tisular adoptan el papel fundamental de mejorar, reemplazar o reparar tejidos funcionales dañados proporcionando una MEC artificial temporal. La amplia gama de materiales utilizados se debe a la gran variedad de posibles tipos de células adheridas y señales biológicas para guiar el crecimiento de la MEC en zonas anatómicas específicas del cuerpo. Dependiendo de la localización, deberán proporcionar las propiedades mecánicas necesarias para las situaciones en las que esté sometido *in vivo*, como fuerzas y tensiones, para así mantener la estructura predefinida (Mauck, 2011).

Los tres principales factores que determinarán el éxito del implante son: las propiedades y biocompatibilidad del implante, el estado de salud del paciente y la pericia del cirujano que realiza y supervisa la operación (Park y Lakes, 2007).

Los biomateriales que se utilizan en ingeniería tisular pueden ser clasificados por su naturaleza en (Bose y Bandyopadhyay, 2013):

- polímeros sintéticos, como son materiales relativamente hidrófobos como el polimetil metacrilato (PMMA),
- polímeros de origen natural, como el colágeno,
- compuestos inorgánicos, como la hidroxiapatita.

El tipo de material a utilizar, además de depender de la aplicación, dependerá del modo de aplicación utilizado, como la implantación mediante cirugía invasiva frente a la simple inyección, o a un procedimiento invasivo (Kohane y Langer, 2008).

El tipo de respuesta producida por el biomaterial puede ser (Bose y Bandyopadhyay, 2013):

- tóxico, si causa la muerte del tejido circundante,
- bioinerte: no es tóxico, pero sí inactivo biológicamente por lo que conduce al fracaso a medio plazo debido a la encapsulación del tejido fibroso; es común en metales,
- bioactivo, si se trata de un material no tóxico y activo biológicamente, forma unión interfacial entre el material y tejido huésped,
- biorreabsorbible, cuando el material es no tóxico y además se degrada *in vivo*,

Esta respuesta debe considerarse de gran importancia debido a que el biomaterial no debe ser sistemáticamente tóxico. Considerando cuáles son los productos de degradación del material, la naturaleza de los reactivos (por ejemplo, amidas, aldehídos, alcoholes), y los grupos residuales de la reacción que han quedado sin reaccionar, entre otros, se puede conocer la respuesta, pudiendo ser beneficiosa o negativa dependiendo de la aplicación (Kohane y Langer, 2008).

La biocompatibilidad que presentará el biomaterial es una característica importante a considerar para evitar la presencia de reacciones adversas. No es una propiedad intrínseca del mismo, ya que dependerá de la zona anatómica, entorno biológico y la aplicación. Es decir, por ejemplo un material puede ser biocompatible para un entorno subcutáneo pero no para aplicar en un nervio (Bose y Bandyopadhyay, 2013).

Además de esto, existen una serie de requisitos que el biomaterial tiene que cumplir. Estos pueden ser fisicoquímicos, mecánicos e incluso de liberación controlada de fármacos, Figura 4, y vendrán impuestos por la aplicación y la función que ha de desempeñar el biomaterial.

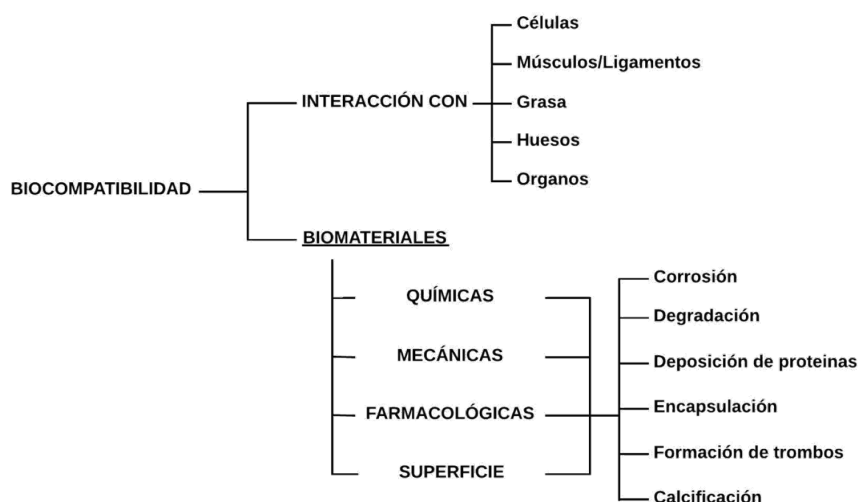


Figura 4. Ilustración esquemática de los aspectos relacionados con la biocompatibilidad de un biomaterial y propiedades que ha de cumplir en función del medio en que se va a usar. Adaptada de (Park y Lakes, 2007).

2.4. SCAFFOLDS COMO SOPORTE EN INGENIERIA TISULAR

Una vez aisladas y expandidas las células y conocidas las propiedades que precisan los biomateriales para poder ser implantados anatómicamente, se les debe conceder una arquitectura tridimensional adecuada para conseguir que estas proliferen y secreten su propia MEC y sustituir, si así se desea, el *scaffold* por tejido nativo a medida que este primero se degrada. Para todo ello, la arquitectura tridimensional debe ser altamente porosa, con una gran superficie específica respecto a su volumen y con las formas deseadas. Con esto se consigue un apropiado tamaño de los poros formados, que favorecerá el alojamiento de células y señales, y una buena interconectividad entre ellos. Fomentando, a su vez, la vascularización del *scaffold* (Chen *et al.*, 2001).

Lo idóneo sería conseguir que el *scaffold* ofreciera estos tres niveles de control, de mayor a menor, en cuanto a arquitectura y composición (Griffith, 2002);

1. Macroescala: composición y forma macroscópica de importancia a escala de milímetros a centímetros.
2. Microescala: el tamaño, orientación y superficie de los poros y canales son fundamentales para el crecimiento del tejido en una escala de cientos de micras. En esta escala se encuentran los diámetros medios de las células humanas. Dependiendo de su función los diámetros varían entre 10 μm hasta un milímetro. (Raisman and Gonzalez, 2008)
3. Nanoescala: textura de la superficie porosa en una escala de hasta pocas decenas de micras.

El control de estas escalas ha sido desarrollado por distintas técnicas de procesado de manera individual. En cambio, las técnicas utilizadas no son capaces por ahora de abarcar las tres de manera simultánea, sobre todo el control sobre la arquitectura y la química de la superficie (Griffith, 2002).

Para la fabricación de *scaffolds* existen diversas técnicas que dan lugar a determinadas propiedades y estructuras porosas en las diferentes escalas. Se pueden clasificar en: convencionales, nanoescala y de prototipado rápido. Para cada una, en la Tabla 1, se exponen las técnicas más relevantes para este trabajo.

Particulate leaching (del inglés, lixiviación de partículas) es una técnica basada en la aplicación de un porógeno, como la sal común, sobre un molde. El tamaño de las partículas puede ser controlada mediante un proceso previo de tamizado, y así obtener el rango deseado. Depositadas en el molde, se vierte el polímero fundido o disuelto o el monómero para que polimerice *in situ* u oligómeros, junto con el entrecruzador e iniciador necesarios. Este puede ser acompañado de un disolvente para conseguir una mayor fluidez entre las partículas de porógeno. Alternativamente, se puede emplear una plantilla porogénica obtenida por sinterizado de partículas, o manojos de hilos colocados en un tubo o canal, etc. Según en el caso, el polímero sólido es obtenido por polimerización, o entrecruzamiento de cadenas, por enfriamiento o por evaporación del disolvente en presencia del porógeno o plantilla. Por último, se introduce el compuesto en una disolvente afín al porógeno pero que no dañe ni disuelva el polímero y así generar la estructura porosa. Con esta técnica es posible controlar parámetros como tamaño de poro y cristalinidad dependiendo de las relaciones másicas porógeno/polímero, velocidades de enfriamiento, etc. (Bostrom *et al.*, 1998).

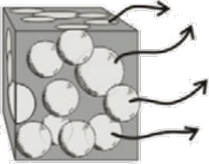


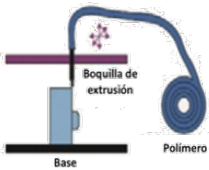
Separación de fases es una técnica termodinámica basada en una mezcla de polímero-solvente que son completamente miscibles a una determinada temperatura, pero a otra distinta se separan en fases. Es posible también tener una mezcla monómero-solvente que sea miscible a una temperatura, pero que se separen en fases a la temperatura de polimerización del monómero. La separación genera una fase rica en polímero y otra en solvente. La primera, el solvente se extrae mediante un tratamiento térmico como evaporación y el polímero es solidificado. En la segunda, el solvente es separado por un tratamiento térmico o por intercambio líquido-líquido con un disolvente volátil (Peter X, 2004).

Electrospinning (del inglés, electrohilado) es una técnica basada en el establecimiento de una diferencia de potencial entre el colector y la salida del polímero. Se emplea una boquilla muy fina por la cual se hace pasar una disolución de polímero con naturaleza dipolar. Debido al campo eléctrico externo generado, los dipolos se inducen a un cambio de posición y el polímero disuelto se estira en

la dirección del colector evaporando el disolvente antes de entrar en contacto con éste. En el colector se recogen hilos, orientados u dispuestos arbitrariamente, que dependiendo de la intensidad aplicada y la distancia entre punta y colector, pueden llegar a ser del orden de nanómetros (Huang *et al.*, 2003).

Modelado por extrusión es una técnica basada en el prototipado rápido mediante impresoras 3D. El *scaffold* es construido por capas ascendentes mediante la extrusión del polímero fundido controlado mediante ordenador y un programa CAD de datos en 2D de la pieza. Con ello se obtiene el *scaffold* final que, a priori, no precisa post-procesado (Lam *et al.*, 2002). Alternativamente, esta técnica puede usarse como técnica para fabricar plantillas porogénicas para la técnica de **Porogen Leaching**. Esta técnica tiene el mismo fundamento que la técnica de *particulate leaching*, en la cual se vierte el biopolímero generando el negativo de la plantilla que tendrá la misma estructura.

Tabla 1. Técnicas de fabricación de *scaffolds*. Adaptada (Dalton y Woodfi, 2008)

	Método	Porosidad y Tamaño	Esquema	Ventajas y Desventajas
Convencional	<i>Particulate leaching</i>	Porosidad < 90% Tamaño de poro 5-600 μm		V: simple y fácil de usar, adecuado con una variedad de biomateriales y no se necesita ningún equipo especial. D: distribución de tamaño de poro no uniforme. Difícil de lograr plena interconectividad. Suelen ser necesarios disolventes orgánicos.
	Separación de fases	Porosidad < 90% Tamaño de poro 5-600 μm		V: sencillo y adecuado para una variedad de biomateriales. No se necesita ningún equipo especial para conseguir interconexión completa entre los poros y de gran tamaño. D: irregularidad de las superficies exteriores de los <i>scaffolds</i> . Suelen ser necesarios disolventes orgánicos.
Nanoescala	Electrohilado (<i>Electrospinning</i>)	Porosidad < 90% Tamaño de poro <1-10 μm		V: método barato para obtener fibras de una amplia gama de polímeros. Excelente compatibilidad celular. Se pueden fabricar <i>scaffolds</i> con grandes poros mediante el uso de cristales de hielo. D: a menudo son necesarios disolventes orgánicos. Es difícil de fabricar <i>scaffolds</i> de gran volumen y tamaño de poro o espesor. Las propiedades mecánicas de las fibras generalmente son pobres.
Prototipado	Modelado por extrusión	Porosidad < 80% Tamaño de poro 100-2000 μm		V: control preciso sobre el tamaño de los poros y la interconectividad. Proceso que permite la fabricación de arquitecturas de complejas con buena resolución. D: Dado que la técnica utiliza polímeros fundibles, se limita a los termoplásticos. Bajo tamaños de poro difícil de lograr mientras se mantiene una alta porosidad.

2.5. REGENERACIÓN DE TEJIDO VASCULAR EN INGENIERÍA TISULAR

La investigación en el ámbito de los tejidos cardiovasculares se ha visto motivada en los últimos 20 años por la necesidad de resolver severos problemas derivados de las enfermedades cardíacas (Nerem y Seliktar, 2001). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012, 17,5 millones de personas fallecieron por enfermedades cardiovasculares, 31 % de las muertes registradas en todo el mundo. De los fallecidos por estas enfermedades, 7,5 millones fueron por cardiopatía coronaria, enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco, y 6,7 millones de accidentes vasculares cerebrales (OMS, 2015)

Una patología de las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis. Esta genera la oclusión de los vasos disminuyendo el flujo sanguíneo que puede dar lugar a infartos. Una de las soluciones que se ha dado a este problema ha sido la sustitución de la zona dañada por vasos autólogos de otros puntos del cuerpo como son las arterias mamarias. Pero esta solución presenta el inconveniente de poseer una baja y limitada disponibilidad (Lizarbe, 2007). Por esta razón, se ha necesitado de la investigación y desarrollo de sustitutos de vasos sanguíneos de diversos diámetros mediante ingeniería tisular. Esta investigación ha dado como fruto métodos para la construcción de vasos sanguíneos de reemplazo, por ejemplo de colágeno, con la funcionalidad biológica apropiada (Nerem y Seliktar, 2001).

Se han llevado a cabo diferentes intentos para sustituir los injertos de vasos sanguíneos o by-pass por ejemplo mediante materiales sintéticos como el politetrafluoroetileno expandido (ePTFE); sin embargo, éste presenta problemas de trombogénesis debido al contacto directo con la sangre y de barrera física por no ser biodegradable (Nerem y Seliktar, 2001).

En paralelo a estos problemas, se realizaron otros estudios donde se probaron técnicas con siembra de células endoteliales, con el fin de disminuir la adhesión plaquetaria, y prótesis biodegradables mediante el uso de polímeros biodegradables como Vycril (copolímero de ácido poliglicólico (PGA)) o polidioxanona, con el fin de usar materiales reabsorbibles y lograr la estabilidad del injerto mientras se desarrolla el nuevo tejido (Falke y Anthony, 2000).

Otro punto crítico de estudio para los injertos cardiovasculares es conseguir *scaffolds* con las propiedades mecánicas de resistencia y elasticidad similares a la de los vasos sanguíneos. El entorno donde van a trabajar es complejo debido a la tensión a que está sometido. Los vasos están sometidos a esfuerzos de presión transmural (presión entre el interior y exterior de la pared vascular), de cizalla y extensión axial, y cada uno va a tener un efecto diferente sobre la pared del vaso, como se observa en la Figura 5. Además, tienen que tener resistencia a la fatiga para que una vez implantados resistan los ciclos de carga y descarga (Schutte y Nerem, 2013).

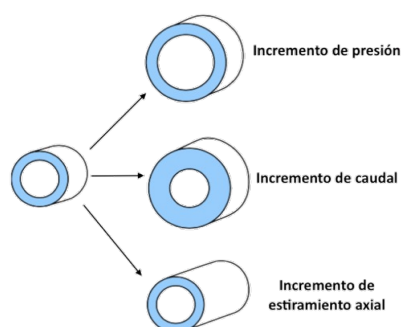


Figura 5. Efectos hidrodinámicos de los vasos sanguíneos. Adaptada de (Schutte y Nerem, 2013).

Los biopolímeros como el PGA y los que contienen ácido poliláctico (PLA), utilizados para tejido intestinal e injertos vasculares respectivamente, han atraído la atención por su fácil procesabilidad. En cambio, han presentado el inconveniente de generar un medio ácido debido al descenso del pH producido por los productos de degradación y que no es deseable ya que daña a las células y tejidos (Bostrom *et al.*, 1998). A pesar de ello, en ocasiones dependiendo de la velocidad de degradación pueden llegar a ser favorables. El PGA y PLA, han sido utilizados como ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) en técnicas de *electrospinning* para la fabricación de *scaffolds* a base de fibras. (Liu *et al.*, 2007)

Con todo esto, se ha seguido con el desarrollo de nuevos biopolímeros sintéticos biodegradables con propiedades adecuadas para ser injertados en contacto con la sangre y con las propiedades biomecánicas adecuadas. En la Tabla 2 se muestra una variedad de materiales propuestos para la ingeniería tisular vascular.

Tabla 2. Ejemplos de materiales sintéticos propuestos en ingeniería tisular vascular.
Adaptada de (Schutte y Nerem, 2013).

Polímero	Descripción	Referencia
Ácido Poliglicólico (PGA)	Fácil de modificar, se puede sintetizar a granel, resistente tras realizarse el cultivo del tejido, vasoactivo.	Niklason <i>et al.</i> , 1999
Ácido Poli (D,L-láctico)-7 co-(1,3- carbonato de trimetileno)	Microesponjas de bajo coste, después del cultivo las propiedades mecánicas son similares a las arterias.	Buttafoco <i>et al.</i> , 2006
Polidioxanona (PDO)-Elastina	PDO tiene una lenta reabsorción y baja respuesta inflamatoria y trombogénica. La elastina permite la adhesión y crecimiento celular y mejor elasticidad.	Sell <i>et al.</i> , 2006
Polietilenglicol (PEG)	Elástico con propiedades mecánicas sintonizables, resistente a la trombosis, se disuelve en solución acuosa y puede ser fotopolimerizado en presencia de células.	Hahn <i>et al.</i> , 2007
Poliglicerol sebacato (PGS)	Elastómero que promueve la adhesión y la proliferación celular, promueve la deposición de elastina.	Gao <i>et al.</i> , 2008

Conocidas la naturaleza, las propiedades mecánicas y las características de los biomateriales utilizados en ingeniería tisular, de entre los biomateriales utilizados en ingeniería tisular vascular se decidió emplear el poliglicerol sebacato en este trabajo fin de grado.

2.6. POLIGLICEROL SEBACATO COMO BIOMATERIAL EN INGENIERÍA TISULAR

Existe una amplia variedad de biomateriales poliméricos sintéticos y bioabsorbibles para aplicaciones biomédicas. Entre todos estos, y desde el año 2002, el poliglicerol sebacato, PGS, ha ido adoptando mayor relevancia en el contexto de la ingeniería tisular por sus idóneas propiedades. El PGS es un poliéster elastomérico biodegradable, flexible, resistente, con una excelente biocompatibilidad y con un bajo coste respecto del resto de biomateriales utilizados en ingeniería tisular (Rai *et al.*, 2012). Debido a su bajo coste, resulta interesante la producción a escala industrial. Con estos atributos, el PGS ha sido explorado y desarrollado para numerosas aplicaciones biomédicas desde la liberación controlada de fármacos hasta la ingeniería tisular como sustituto de músculo cardíaco (Mauck, 2011).

Comprender las propiedades que posee cualquier biomaterial en profundidad es de vital importancia para conseguir extraer todo su potencial de posibles aplicaciones. Por ello, se han realizado ensayos físico-químicos mediante FTIR donde se han obtenido picos que afirman que los grupos ácidos reaccionaban con los grupos alcohol para formar un poliéster (Rai *et al.*, 2012). En los ensayos mecánicos, de resistencia a la tracción, se han mostrado características elastoméricas similares a la de los tejidos blandos. El módulo de Young se encuentra en el rango de 0,01-1,5 MPa con un rango óptimo de 0,4-0,7 MPa, similar al miocardio del corazón humano que oscila entre 0,02-0,5 MPa. Además, presenta una elongación máxima entre 1,2 y 3 veces de su longitud original. Estas propiedades pueden ser optimizadas, por ejemplo, mediante un aumento de temperatura de curado hasta 130 °C para conseguir un módulo mecánico de hasta 1,2 MPa, teniendo en cuenta que el glicerol puede perderse por evaporación, o incluso, con la adición de agentes entrecruzantes (Loh *et al.*, 2015).

Por otro lado, también se han realizado ensayos térmicos mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), donde se ha mostrado que se trata de un polímero semicristalino y que sus propiedades térmicas dependían de su temperatura de transición vítrea (T_g) de la fase amorfa y de la temperatura de fusión (T_m) de la fase cristalina. Con este ensayo, se han revelado dos temperaturas de cristalización -52,14 °C y -18,50 °C junto con dos temperaturas de fusión de 5,23 °C y 37,62 °C, sin observarse temperatura de transición vítrea por encima de -80 °C, lo que confirma que el polímero es totalmente amorfo a la temperatura corporal de 37 °C. En ensayos mecánicos de flexión se ha observado la capacidad del PGS de volver a su forma inicial, lo que revela que la red tridimensional actuó como parte fija y la amorfa como parte reversible (Rai *et al.*, 2012).

Por último, en los ensayos de biodegradación se ha mostrado que el PGS se degrada mediante erosión superficial y muestra una pérdida de masa lineal manteniendo su resistencia mecánica. Esta propiedad es significativa en aplicaciones en las que se requiere que el material vaya degradándose paulatinamente con el desarrollo de la MEC (Loh *et al.*, 2015).

El objetivo del diseño del PGS, al igual que otros biopolímeros elastoméricos, ha sido el de imitar las propiedades mecánicas de la MEC, que está constituida por una red tridimensional covalente entrecruzada y que presenta propiedades elásticas debido al entrecruzamiento y a los puentes de hidrógeno formados entre grupos hidroxilo (Sundback *et al.*, 2005).

El proceso de síntesis del PGS es llevado a cabo mediante una reacción de policondensación donde intervienen el glicerol y el ácido sebácico, como se muestra en la Figura 6. El glicerol es un poliol incoloro, inodoro y no tóxico, usado en aplicaciones farmacéuticas y alimentarias. El ácido sebácico es

un monómero no tóxico por ser un intermedio metabólico natural en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, que también es usado para la administración de fármacos (Loh *et al.*, 2015).

Asimismo, el diseño del proceso de síntesis debe tener en cuenta cinco requisitos (Rai *et al.*, 2012):

1. El polímero debe ofrecer degradación hidrolítica para minimizar la diferencia cinética causada por la degradación enzimática.
2. Debe aportar enlaces químicos hidrolizables para compensar los efectos enzimáticos de las propias células adheridas.
3. Debe presentar un grado de entrecruzamiento tal que se consiga un material elástico y resistente, pero a su vez con un tiempo de biodegradación acorde con la aplicación.
4. El entrecruzamiento entre cadenas debe ser entre enlaces hidrolizables idénticos a los de la estructura principal, para así evitar al máximo la degradación heterogénea.
5. Uno de los monómeros posee un grupo trifuncional (glicerol) y el otro un grupo funcional carboxílico (ácido sebácico) en ambos extremos.

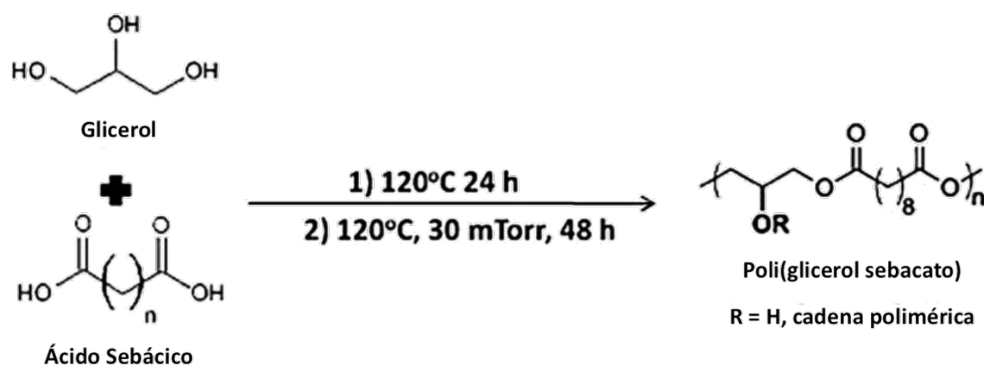


Figura 6. Reacción química de síntesis del poliglicerol sebacato.
Adaptada de (Loh *et al.*, 2015).

Hasta conseguir las condiciones de reacción ideales se llevaron a cabo diversos procedimientos donde se variaba la presión, la temperatura y la relaciones estequiométricas. Las primeras pruebas se realizaron en ausencia de catalizador bajo condiciones inertes a una temperatura de 120 °C, 1 Torr y durante 24 horas. Tras ese tiempo se redujo la presión a 40 mTorr durante 5 horas adicionales para obtener el prepolímero (a partir de ahora se denomina prepolímero al producto de reacción obtenido tras 24 horas de reacción). Una vez transcurridas, se prolongó durante 48 horas a 120 °C para así conseguir el entrecruzamiento entre cadenas. En la Figura 6 se ha mostrado la reacción mediante el método mejorado, en el cual se adicionó nitrógeno gas durante la etapa de prepolimerización (Loh *et al.*, 2015). En otros estudios se buscó la polimerización *in vivo*, desestimada por las severas condiciones de reacción. Esto condujo a la modificación del PGS con la incorporación de acrilatos y así realizar una fotopolimerización *in vivo* con radiación UV, estrategia que consiguió reducir de forma drástica el tiempo de curado a tan solo unos pocos minutos. En cambio, la biodegradación se ve afectada negativamente por obtener un copolímero con acrilatos, ya que esto son más bioestables (Rai *et al.*, 2012).

En estudios cinéticos de la reacción se testearon tres relaciones molares (0.6, 0.8 y 1.0) y tres temperaturas (120, 130 y 140 °C) y se evaluaron mediante espectroscopia FT-Raman, técnica capaz de determinar la presencia de grupos terminales. Se obtuvieron resultados de una cinética de primer orden respecto de la concentración de ácido sebácico, y la constante de velocidad de la reacción (k) aumentaba hasta 4,5 veces a cambios de 20 °C. Además, se pudo conocer el mecanismo de la reacción mostrado en la Figura 7, donde en el primer paso se forma un monoéster, en el segundo éste reacciona con otro grupo hidroxilo y por último se disocia una molécula de agua para formar la sucesión de cadenas. El símbolo wavy hace referencia a todas las especies de alcohol o ácido presentes en la mezcla. (Maliger *et al.*, 2013).

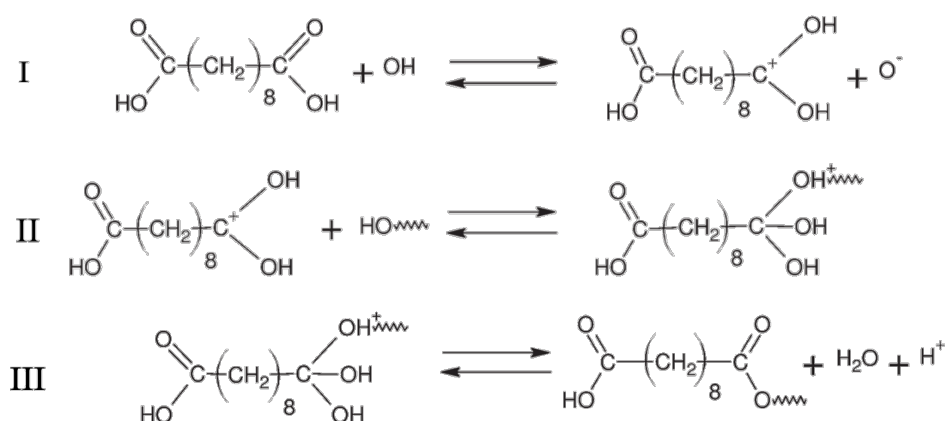


Figura 7. Esquema detallado del proceso de policondensación de PGS.
Adaptada (Maliger *et al.*, 2013)

Este proceso de síntesis ha sido adaptado para la fabricación de *scaffolds* para aplicaciones de ingeniería tisular vascular. La adaptación ha dependido de la técnica utilizada para la fabricación y de las propiedades que se buscan. Se han utilizado técnicas como:

- *Particulate Leaching* con cloruro sódico, donde se han generado poros debido a la sal y una microporosidad debida a la evaporación del glicerol durante el proceso de curado (Loh *et al.*, 2015).
- *Contact guidance*, donde se hizo uso de un molde de silicio como negativo producido por fotolitografía de cristal de silicio de 100 μm y disuelto con una solución de *Piranha* (Bettinger *et al.*, 2006).
- *Electrospinning*, para obtener fibras mediante una mezcla de PGS con PCL a distintas proporciones y disueltos en una mezcla etanol/cloroformo. El PGS es mezclado con la PCL porque esta tiene una velocidad de degradación inferior (Sant *et al.*, 2013).

En el caso de las técnicas de *contact guidance* y *electrospinning*, a pesar de conseguir *scaffolds* con ciertas características deseables, tienen inconvenientes para aplicarse en regeneración vascular como, por ejemplo, los *scaffolds* formados mediante fibras las cuales no conforman una matriz porosa con una superficie redondeada deseable para el alojamiento de las células. En el caso de la técnica *contact guidance* sí lo consigue, pero es un proceso con cierta dificultad de realización y con necesidad de costosos pasos intermedios. En cuanto a la técnica de *particulate leaching*, aun siendo relativamente

sencilla, el proceso precisa de un previo tamizado y prensado de la sal que presenta una baja repetitividad. Con esto, entra en juego un mayor número de variables a controlar.

Las técnicas que se van a utilizar en este trabajo de fin de grado para la fabricación de *scaffolds* de PGS son la separación de fases, ya que todavía no ha sido empleada con anterioridad y *particulate leaching* con esferas de tamaño conocido. Además, se utiliza una plantilla porogénica fabricada por impresión 3D para hacer uso de la técnica de *porogen leaching* de forma que se podrán comparar los resultados con la técnica de *particulate leaching*.

La separación de fases parte con la ventaja de no necesitar de procesos de preparación anteriores o intermedios, lo que implica un menor nivel de dificultad de proceso, un menor número de parámetros a controlar, y por tanto, mejor control de las características que se desean obtener. Para la técnica de *particulate leaching* se parte con la misma ventaja ya que, a diferencia del proceso con sal, se utilizan esferas de porógeno de un tamaño conocido y proporcionado por el fabricante. La conformación de estas favorece a la obtención de poros redondeados y homogéneos.

2.7. MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha desarrollado en los laboratorios del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, CBIT, en primer lugar, con el fin de consolidar la formación de la titulación de Grado en Ingeniería Química, dar paso a la titulación de Master en Ingeniería Química y de forma conjunta consolidar los conocimientos aprendidos en la asignatura de Biopolímeros en el ámbito de las técnicas y aplicaciones de la ingeniería tisular.

En segundo lugar, como es sabido, a día de hoy uno de los principales propósitos de la sociedad es dar soluciones a las principales causas de muerte. La mayor causa de muerte en el mundo según la OMS es la producida por enfermedades cardiovasculares (OMS, 2016). Por ello, con este trabajo se pretende contribuir con el desarrollo de nuevas estructuras porosas para su posterior aplicación como vasos sanguíneos biodegradables con el fin de dar aportar una nueva alternativa en la búsqueda de las soluciones a estas enfermedades.

3. NORMATIVA

El presente Trabajo Final de Grado se ha desempeñado en los laboratorios del CBIT en los que es necesario conocer y cumplir de forma rigurosa la vigente normativa aplicable al trabajo en un laboratorio, al almacenamiento de sustancias químicas y la posterior gestión de residuos. A fecha de entrega, 11 de Julio de 2016, la normativa vigente es la que sigue:

- La Ley 54/2003, de 12 de diciembre, BOE nº 298, 13/12/2003, de reforma del marco normativo respecto de la **prevención de riesgos laborales**. Esta Ley tiene por objeto, la reforma del marco normativo de la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales, el reforzamiento de la función de vigilancia y control del sistema de Inspección de Trabajo y Seguridad Social. Y con los objetivos de combatir activamente la siniestralidad laboral, fomentar la cultura de prevención de riesgos en el trabajo, reforzar la necesidad de la integración de esta prevención en los sistemas de gestión de la empresa y mejorar el control del cumplimiento de la normativa mediante una norma sancionadora.
- El Real Decreto 374/2001, de 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**. BOE nº104, 01/05/2001. El Real Decreto presente tiene por objeto, en el marco de la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales, determinar las garantías, responsabilidades y medidas mínimas que deben adoptarse y que se precisan para establecer un adecuado nivel de protección de la salud de los trabajadores frente a los riesgos derivados de la presencia de agentes químicos en el lugar de trabajo y cualquier actividad que los englobe.
- El Real Decreto 598/2015, de 3 de julio, BOE nº82, 05/04/2003, por el que en el artículo tercero se modifica el Real Decreto 665/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los **riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo**. La mayor parte de estas modificaciones se derivan de la ampliación del ámbito de aplicación del Real Decreto 665/1997 a los agentes mutágenos. Este Real Decreto tiene por objeto, en el marco de la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales, la protección de los trabajadores contra los riesgos para su salud y su seguridad derivados o que puedan derivarse de la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo, así como la prevención de dichos riesgos. Además, se establecen las disposiciones mínimas aplicables a las actividades en las que los trabajadores estén o puedan estar expuestos a agentes cancerígenos como consecuencia de su trabajo.
- El Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de **equipos de protección individual**, BOE nº140 12/06/1997. El presente Real Decreto establece, en el marco de la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales, las disposiciones mínimas de seguridad y de salud para la elección, utilización por los trabajadores en el trabajo y mantenimiento de los equipos de protección individual.

- Real Decreto 379/2001, de 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, BOE nº112, 10/05/2001. El presente tiene por objeto establecer las condiciones de seguridad de las instalaciones de almacenamiento, carga, descarga y trasiego de productos químicos peligrosos.
- Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados BOE nº181, de 29/07/2011. Esta Ley tiene por objeto regular la **gestión de los residuos** impulsando medidas que prevengan su generación y mitiguen los impactos adversos sobre la salud humana y el medio ambiente asociados a su generación y gestión, mejorando la eficiencia en el uso de los recursos. Tiene asimismo como objeto regular el régimen jurídico de los suelos contaminados.

3.1. GESTIÓN DE RESIDUOS DE PRODUCTOS QUÍMICOS EN LA UPV

Bajo el lema "el mejor residuo es el que no se genera", (Unidad de Medio Ambiente, 2014) la UPV, año tras año, trata de concienciar y transmitir al alumnado la importancia de los residuos químicos y lo que implican para el medio ambiente. Por ello, la UPV se compromete a mantener el sistema de gestión ambiental homologado de Ecoetión y Ecoauditoría (EMAS) y la norma ambiental UNE EN ISO 14001 (Unidad de Medio Ambiente, 2016).

Para la gestión de los residuos de productos químicos en la UPV, según la Unidad de Medio Ambiente, UMA, para la minimización de la generación del residuo se debe evitar la utilización de productos dañinos para el medio ambiente sustituyéndolos por otros más respetuosos y minimizar la producción de los mismos. Asimismo, propone una clasificación de los residuos en 18 grupos, de los cuales para este Trabajo Final de Grado se han hecho uso de los siguientes:

Grupo 2: Disolventes no halogenados

Grupo 3: Disolventes halogenados

Grupo 7: Aceites y grasas, hidrocarburos y combustibles

Grupo 18: Envases vacíos de reactivos y vidrio Pyrex

Cabe recordar que no se deben mezclar nunca residuos de diferentes grupos para evitar posibles reacciones de incompatibilidad. Por ello, los residuos generados a lo largo del proyecto se identifican según al grupo que pertenecen y son introducidos en el contenedor homologado y proporcionado por la UMA. Estos están identificados con la etiqueta correspondientemente al grupo que pertenecen y son almacenados en condiciones adecuadas de seguridad e higiene hasta ser entregados a la empresa gestora autorizada. Para cumplir con la legislación, el tiempo de almacenado no puede exceder de seis meses.

4. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el presente proyecto es esencial conocer previamente los reactivos y sustancias, así como el montaje de los equipos utilizados, para poder llevar a cabo el procedimiento experimental.

4.1. REACTIVOS, PORÓGENOS Y OTRAS SUSTANCIAS

En el proceso de fabricación de *scaffolds* de PGS se hizo uso de los reactivos y sustancias que se recogen en la Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5. En el Anexo 1 se puede consultar las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3 donde se detallan las principales propiedades de estos.

Tabla 3. Reactivos para la síntesis de PGS.

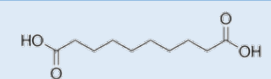
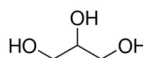
Reactivo	Marca comercial	No. CAS	Estructura
Ácido sebácico	Sigma-Aldrich	111-20-9	
Glicerol	Sigma-Aldrich	56-81-5	

Tabla 4. Porógenos utilizados para la fabricación de *scaffolds* de PGS.



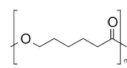
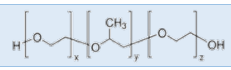
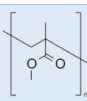

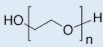


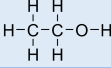
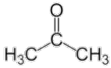
Porógeno	Marca comercial	No. CAS	Estructura
N,n-Dimetilformamida (DMF)	Scharlau	68-12-2	
Naftaleno	Scharlau	91-20-3	
n-octano	Sigma-Aldrich	111-65-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$
Policaprolactona (PCL)	Polysciences	24980-41-4	
Pluronic P123	Sigma-Aldrich	90003-11-6	
Pluronic F127	Sigma-Aldrich	90003-11-6	$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x(\text{C}(\text{CH}_3)_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{OH}$
Poli(metil metacrilato) (PMMA)	Polysciences	9011-14-7	
Poli(etil metacrilato) (PEMA)	Polysciences	9003-42-3	
Óxido de polietileno (PEO)	Polysciences	25322-68-3	
Alcohol polivinílico (PVA)	Formfutura	9002-89-5	
Parafina	Sigma-Aldrich	8012-95-1	n/a

Tabla 5. Sustancias utilizadas para el proceso de síntesis de PGS

Sustancia	Marca comercial	No. CAS	Estructura
Tetrahidrofurano (THF)	Sigma-Aldrich	109-99-9	
Nitrógeno gas (N ₂)	Carbueros Metálicos	7727-37-9	N≡N
Etanol	Scharlau	64-17-5	
Acetona	Scharlau	67-64-1	
Aceite mineral (Z603910)	Sigma-Aldrich	n/a	n/a

4.2. UTENSILIOS Y MATERIAL DE LABORATORIO

- Espátula de metal
- Espátula de plástico
- Varilla de vidrio
- Imán agitador
- Base de corcho del matraz de tres vías
- Matraz esférico de tres vías en ángulo
- Matraz esférico de tres vías paralelas
- Matraz aforado 50 ml
- Embudo de vidrio
- Pinzas de metal
- Micropipeta de 1 ml
- Puntas para micropipeta
- Pipeta Pasteur de vidrio
- Codo de vidrio diámetro 14/23
- Codo de vidrio diámetro 29/32
- Trampa de nitrógeno
- Jeringa trampa de nitrógeno
- Tapones *septum*
- Abrazadera de plástico para codos
- Vaselina
- Parafilm
- Molde de cristal
- Molde de teflón
- Pinzas para molde
- Embudo de vidrio
- Viales de vidrio
- Vaso de precipitados 100 ml
- Vaso de precipitados 1000 ml
- Vidrios de reloj
- Papel de aluminio
- Papel de plástico adhesivo
- Mortero
- Guantes térmicos
- Bolsas Zip
- Malla de nylon
- Grapas
- Cuchillas

4.3. EQUIPOS Y ACCESORIOS

- Balanza de precisión
- Plato agitador-calefactor y termopar
- Base metálica para matraz esférico
- Horno
- Manta calefactora
- Bomba circuito de refrigeración
- Desecador y bomba a vacío
- Cromatógrafo de gases
- Microscopio electrónico de barrido
- Kit de accesorios de densidad de la balanza de precisión
- Analizador termomecánico

4.4. MONTAJE

4.4.1. Montaje para el protocolo de prepolimerización

En las Figuras 8 y 9 se muestran los montajes experimentales de los reactores discontinuos de tanque agitado (RDTA) para realizar la reacción de prepolimerización mediante el protocolo estándar y mediante el protocolo optimizado, respectivamente.

Para el protocolo estándar, se hace uso de un RDTA compuesto por una placa agitadora-calefactora con acople metálico donde va insertado el matraz esférico de tres vías, con ángulo o paralelas indistintamente. A éste se le acopla por la derecha la vía de nitrógeno gas que proviene de la bombona, por la izquierda el termopar mediante un tapón *septum* y en el centro el codo, que a su vez, va conectado a la trampa de nitrógeno mediante una jeringa introducida en el tapón *septum*. Todas las conexiones que no utilizan tapón *septum* deben ir fijadas con vaselina y con la abrazadera de plástico correspondiente al diámetro oportuno; la trampa de nitrógeno se muestra en detalle en la Figura 10. Cabe destacar que si se utiliza el matraz esférico de tres vías paralelas de tamaño 14/23, se debe utilizar el codo que tiene las boquillas de mismo diámetro para que acoplen correctamente.

Para el protocolo optimizado, se hace uso de un montaje idéntico del RDTA pero se sustituye la base metálica donde va insertado el matraz esférico por un vaso de precipitados de 1000 ml que contiene aceite de gran capacidad calorífica, para conseguir un baño termostático. Para este montaje se recomienda hacer uso del matraz esférico de tres vías paralelas, ya que este consigue una inmersión completa en el aceite, como se muestra en la Figura 9.

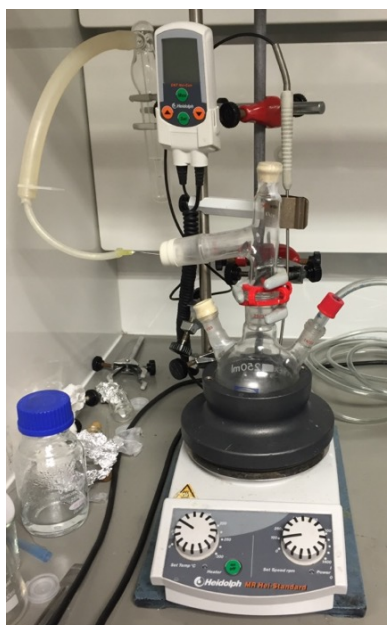


Figura 8. Montaje experimental para el protocolo estándar.

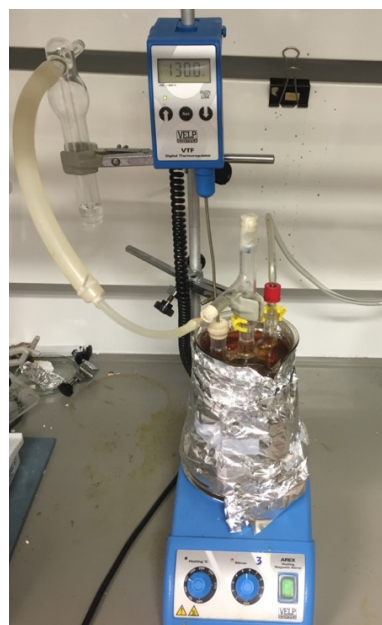


Figura 9. Montaje experimental para el protocolo optimizado.



Figura 10. Detalle de la trampa de nitrógeno.



Figura 11. Detalle del montaje del baño termostático.

4.4.2. Montaje para el protocolo de curado

Para el proceso de curado, dependiendo del resultado a obtener, se hace uso o bien del molde de vidrio y teflón, mostrado en la Figura 11, o de viales. Ambos son introducidos en un horno de convección forzada, Figura 12.

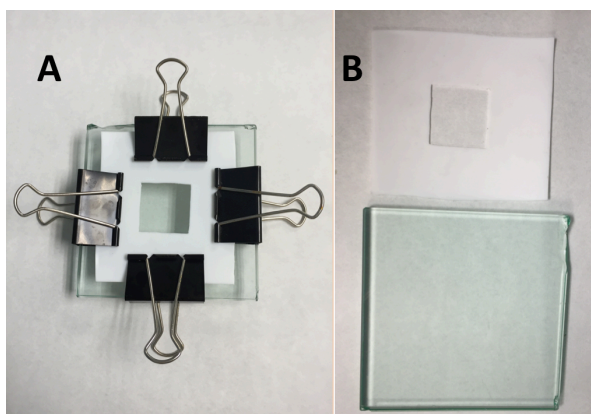


Figura 12. Molde para el curado de *films* de PGS.
A) Molde montado anclado con pinzas metálicas.
B) Molde de cristal forrado de plástico adhesivo y molde de teflón.



Figura 13. Horno para el curado del prepolímero de PGS.

4.4.3. Montaje para el lavado de *scaffolds*

Para el lavado de los *scaffolds* obtenidos se hace uso del montaje con reflujo mostrado en la Figura 13, compuesto por una manta calefactora en la que se introduce el balón que está conectado con un serpentín. El serpentín, a su vez, está conectado con un circuito de refrigeración compuesto por una bomba y un baño de agua, Figura 14.

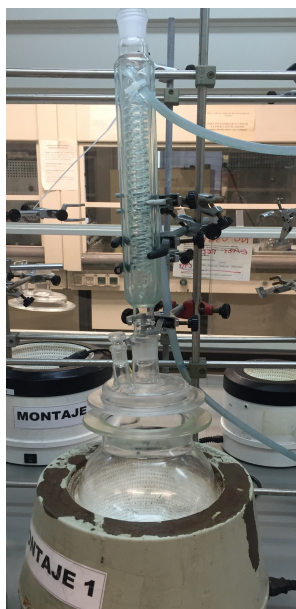


Figura 14. Montaje para el lavado de *scaffolds*.



Figura 15. Bomba para circuito de refrigeración.

4.4.4. Montaje para el ensayo de microscopia electrónica de barrido

El ensayo de microscopia electrónica de barrido se ha realizado mediante el equipo JSM-5410, mostrado en la Figura X, que pertenece al Servicio de Microscopía de la UPV.



Figura 16. Microscopio electrónico de barrido JSM-5410.

4.4.5. Montaje para el ensayo de densidad y porosidad

El montaje para realizar los ensayos de densidad y porosidad está compuesto por la balanza de precisión Mettler Toledo AE-240 ensamblada con el kit de accesorios para ensayo de densidad Mettler Toledo ME-33360, como se muestra en la Figura 17, y por el desecador a vacío mostrado en la Figura 18.



Figura 17. Balanza de precisión montada con el kit de ensayo de densidad.

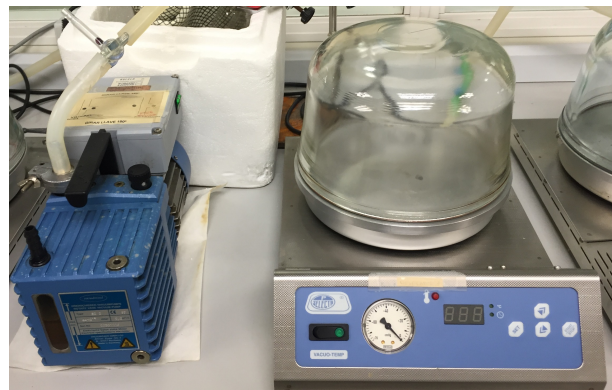


Figura 18. Desecador a vacío y bomba de vacío.

4.4.6. Montaje para el ensayo mecánico de compresión

El ensayo mecánico de compresión ha sido realizado mediante el analizador termomecánico Seiko TMA/SS6000 colocado sobre una mesa antivibración "Halcyonics MOD-1M plus", mostrado en la Figura 19, el cual está equipado con el vástago cilíndrico de 8 mm de diámetro de la Figura 20.

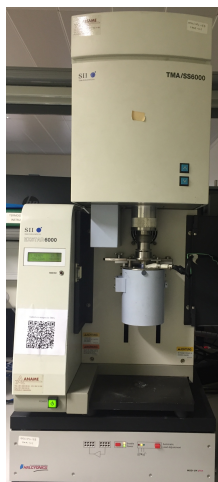


Figura 19. Analizador termomecánico Seiko TMA/SS6000.

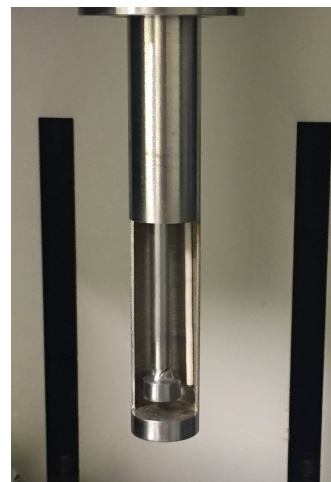


Figura 20. Detalle del vástago del analizador.

4.4.7. Montaje para el análisis químico de cromatografía de gases

El análisis químico de cromatografía de gases ha sido realizado mediante el equipo Agilent Technologies 7820A mostrado en la Figura 21. En la Figura 22 se muestra el portamuestras en detalle donde tiene lugar la inyección de la sustancia problema en disolución con la fase móvil.



Figura 21. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A.

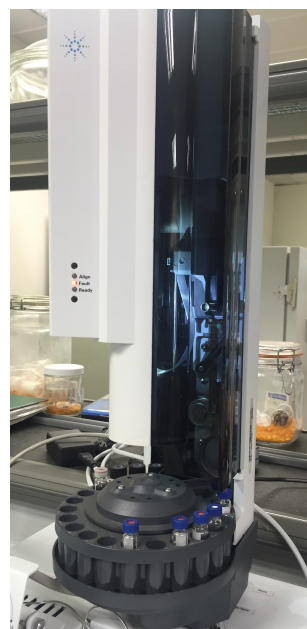


Figura 22. Portamuestras en detalle del cromatógrafo Agilent Technologies 7820A.

4.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para la fabricación de PGS se emplean los reactivos ácido sebácico (AS) y glicerol. En la Figura 23 se observa el diagrama de bloques del proceso de obtención de los diferentes tipos de muestras de estudio. El proceso de síntesis está dividido en dos fases:

- 1º. Fase de prepolimerización: da lugar una reacción de policondensación entre los reactivos, como se observa en la Figura 5. En esta fase se generan cadenas largas poco ramificadas, debido a que se cree que existe prioridad por generar enlaces entre los grupos laterales del glicerol y el AS. Y por lo contrario, es posible que se genere una baja proporción cadenas cortas ramificadas, debido a un impedimento estérico del grupo funcional intermedio del glicerol.
- 2º. Fase de curado: da lugar el entrecruzamiento por policondensación entre cadenas de prepolímero formando una red tridimensional.

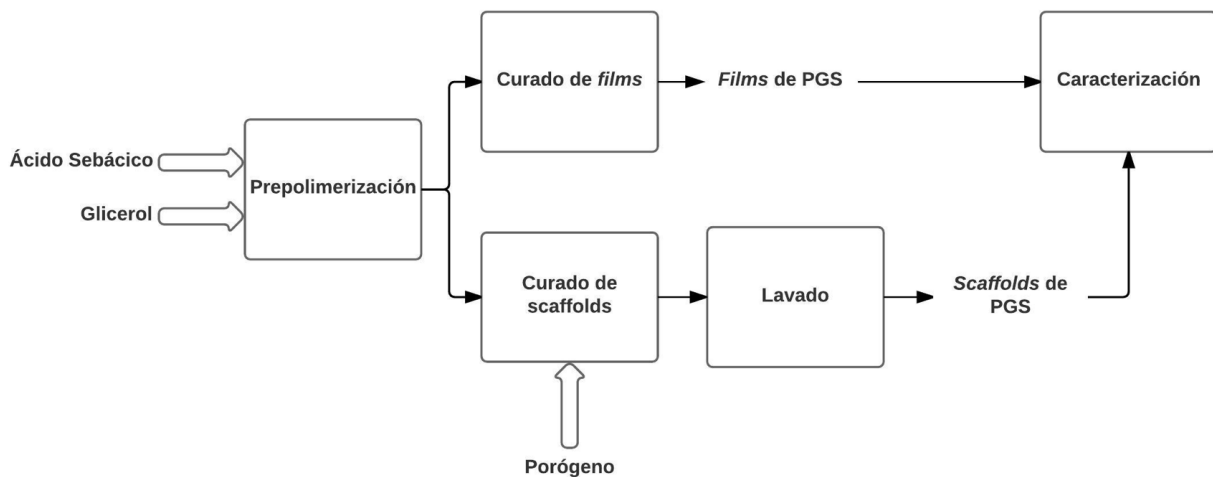


Figura 23. Diagrama de bloques del proceso completo.

En los apartados siguientes se expone el procedimiento detallado realizado para cada fase.

4.5.1. Protocolo estándar para la fase de prepolimerización de PGS

Para iniciar el protocolo estándar, en primer lugar, se hallan las proporciones másicas correspondientes para cada reactivo. A pesar de que la estequiometría de la reacción es 2 mol de AS por 3 mol de glicerol, se ha tenido en cuenta que un exceso de glicerol favorece la cinética y la termodinámica de la reacción desplazando el equilibrio hacia la formación de productos. Además, a la temperatura de prepolimerización el glicerol puede evaporarse, por lo que se toma una relación estequiométrica equimolar. Por tanto, la masa se calcula como:

$$\left. \begin{array}{l} n = \frac{m}{PM} \quad \text{Ec. 1} \\ n_1 = n_2 \quad \text{Ec. 2} \end{array} \right\} \frac{m_1}{PM_1} = \frac{m_2}{PM_2} \quad \text{Ec. 3} \longrightarrow \frac{m_1}{m_2} = \frac{PM_1}{PM_2} \quad \text{Ec. 4}$$

donde:

- n_1 y n_2 = moles de glicerol y ácido sebácico, respectivamente
- m_1 y m_2 = masa de glicerol y ácido sebácico, respectivamente (g)
- PM_1 y PM_2 = moles de glicerol y ácido sebácico, respectivamente (g/mol)

Los pesos moleculares de ambos reactivos se pueden consultar en la Tabla 1.2 del Anexo 1. De la Ecuación 4 se obtiene una relación entre ambos de 2,2, por lo que se toman 4,4 g de AS por cada 2 g de glicerol adicionado.

Con la ayuda de la balanza de precisión, se tara el conjunto de soporte de caucho, matraz esférico de tres vías e imán. Seguidamente, se adiciona la cantidad de SA mediante una espátula de material plástico, para evitar que el SA se adhiera a las superficies por la carga estática, y se anota el peso real en la hoja de control que se encuentra en el Anexo 3. Posteriormente, se tara de nuevo el conjunto y con la ayuda de una pipeta se adiciona el glicerol.

Cabe destacar el especial cuidado que se debe adoptar una vez ambos reactivos son introducidos en el matraz esférico de tres vías, ya que las esferas de AS pueden quedar adheridas a las paredes del matraz, siendo de vital importancia arrastrarlas hasta el fondo junto al glicerol, para así conseguir el contacto total entre ambos reactivos.

Por último, se traslada el conjunto a la cabina de extracción para ensamblar el RDTA mostrado en la Figura 8. Se ajusta la presión ligeramente por encima de la atmosférica observando un burbujeo lento en la trampa de nitrógeno y se aumenta la temperatura de set-point a 140 °C durante 30 minutos, para el fundido del AS. Transcurridos estos, se disminuye la temperatura hasta 130 °C, se activa la agitación entre 100-150 rpm y se anota la hora de inicio. En este instante da comienzo la reacción y deben contabilizarse 24 horas. Transcurridas las 24 horas el prepolímero estará preparado para pasar a la siguiente fase del proceso.

4.5.2. Protocolo optimizado para la fase de prepolimerización de PGS

Tras realizar una experiencia con el montaje estándar de prepolimerización, nace la necesidad de optimizar el proceso para conseguir una mayor productividad y eficiencia. Esto es debido a la baja producción de prepolímero que se es capaz de obtener y de la posible transmisión de calor ineficiente cuando se aumentan las cantidades de los reactivos, ya que el calor no se consigue repartir homogéneamente y se generan diferentes fases.

Por ello, el requisito fundamental para el nuevo RDTA es una precisa transmisión de calor entre la placa calefactora y los reactivos para que la reacción tenga lugar correctamente. En base a esto, se opta por un baño termostático de aceite con un alto calor específico, Figura 11. Con ello se consigue un aumento del área de transmisión de calor, y por tanto, un aumento de calor cedido hacia el interior del matraz, que además se transmitirá de forma más eficiente, ya que se encuentra totalmente sumergido en el aceite (a diferencia del protocolo estándar, donde el matraz solo está en contacto en forma de semiesfera). El baño de aceite se envuelve con papel de aluminio para así minimizar las pérdidas por convección con el aire del ambiente y por radiación con las inmediaciones.

Para asegurar el correcto funcionamiento del RDTA optimizado se realizó un primer test con aceite en el interior, en lugar de los reactivos. Para ello, se ensambló el matraz de tres vías paralelas junto con el resto de accesorios como si de una prepolimerización se tratara y se dio inicio. Una vez se supervisó de que la placa calefactora era capaz de mantener el aceite del interior a una temperatura constante de 130 °C, y sin fluctuaciones considerables, se concluyó como satisfactoria la prueba y se puso en funcionamiento.

El principal propósito para optar por este protocolo es, sobre todo, el aumento de las cantidades de prepolímero que se pueden obtener en cada lote, dado que se asegura que la transmisión de calor hacia los reactivos va a ser la correcta. Gracias a este proceso de optimización, la cantidad de reactivos cargados en el RDTA pudo cuadruplicarse, es decir, se introducen 8 gramos de glicerol y 17,6 gramos de AS en vez de 2 y 4,4, respectivamente. Es posible multiplicar la carga inicial por cinco e incluso por seis respecto al proceso convencional, pero las experiencias a llevar a cabo no requieren de tanta cantidad de prepolímero. A pesar de que se trata de un proceso que trabaja por lotes, y no en continuo como lo hacen los reactores pistón, se puede considerar que las cantidades que se obtienen con este método son significativas para la cantidad que se utiliza en la fabricación de un *scaffold* de PGS. Por

tanto, el procedimiento a seguir es idéntico al protocolo estándar, pero con los matices de eliminar la base metálica cóncava de la placa agitadora y el requisito de precalentar el aceite a 130 °C con el horno antes de pesar los reactivos. A la hora de ensamblar el matraz de tres vías paralelas cabe tener especial cuidado de asegurarse de que este está totalmente sumergido.

Transcurridas las 24 horas, se anota la hora de finalización, se detiene la agitación, se apaga la placa calefactora y se cierra la llave de la botella de nitrógeno. Con ello, se desconecta la vía de nitrógeno, el termopar y la jeringa de la trampa de nitrógeno. No es necesario desconectar el codo, ya que será de ayuda para poder manipular el matraz sin sufrir quemaduras. Por último, con los guantes térmicos puestos, se traslada al banco de trabajo el matraz junto con el baño de aceite.

Es importante destacar la importancia de la temperatura a la que se mantiene el prepolímero. Por un lado, se considera que la reacción disminuye su cinética hasta el punto de que esta se detiene cuando su temperatura desciende de 130 °C durante un tiempo prudencial de 30 minutos.

Por otro, para su manipulación este descenso no debe ser excesivo, ya que el prepolímero aumenta significativamente su viscosidad y dificulta su manipulación, por ello se mantiene en el matraz sumergido en el aceite.

Una vez realizado el protocolo optimizado de prepolimerización de PGS es posible continuar con la fase de curado.

4.5.3. Protocolo de curado de PGS

En la fase de curado, como se observa en la Figura 23, se fabrican *films* de PGS para obtener muestras patrón y *scaffolds* de PGS con el uso de porógenos.

El protocolo de curado, para ambos casos, tiene el siguiente procedimiento ya establecido:

1. Se realiza el protocolo optimizado de prepolimerización.
2. Se precalienta un horno a 130 °C.
3. Se preparan los moldes.
4. Se vierte el prepolímero en el molde.
5. Se introducen las muestras en el horno durante 48 horas.
6. Transcurridas las 48 horas, se extraen las muestras.
7. Se acondicionan y almacenan las muestras.

Dependiendo de si se van a fabricar *films* o *scaffolds* de PGS, el protocolo se verá modificado y ampliado de diferente modo. En el caso de la fabricación de *scaffolds*, se ha prescindido del horno que trabaja a vacío (Loh et al., 2015), ya que según experiencias realizadas en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la UPV, el protocolo de curado exhibe los mismo resultados con un horno convencional y acomoda el proceso (Rivero Gimeno, 2015). Asimismo, dependiendo del tipo de porógeno planteado y empleado, el procedimiento de curado se va a clasificar en experimentos diferentes que se han llevado a cabo.

4.5.3.1. Fabricación de films de PGS

En la fabricación de *films*, antes de detener la reacción de prepolimerización, se han preparado los moldes de teflón forrando la base de cristal con plástico adhesivo, teniendo especial cuidado en no dejar burbujas que puedan modificar la superficie de la muestra como se observa en la Figura 12.

Una vez dispuestos los moldes preparados, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se vierten 3 gramos del prepolímero en cada uno a la vez que se va girando el molde hasta que se consigue cubrir homogéneamente toda el área. Finalmente, se introducen todas las muestras en el horno para que tenga lugar el curado.

Una vez concluido y anotada la hora de finalización, se extraen del horno con guantes térmicos. Se depositan sobre el banco de trabajo dejando unos instantes para que se acondicionen a la temperatura ambiente y poder manipularlas sin dañarlas. Se desmonta el molde y con la ayuda de las pinzas se separa el *film* de este. Los *films* fabricados tienen unas dimensiones aproximadas de 3 cm de ancho por 3 cm de largo y 2 mm de alto. Estos se introducen en una bolsa hermética rotulada con la información más relevante.

4.5.3.2. Fabricación de scaffolds de PGS

En la fabricación de *scaffolds* se ha mantenido el proceso optimizado de prepolimerización pero, a diferencia de la fabricación de *films*, el prepolímero se mezcla o combina con una serie de sustancias que van a actuar como porógeno. Estas sustancias son de distinta naturaleza, como se muestra en la Figura 24, y todas las utilizadas con este fin están enumeradas en la Tabla 4 en el apartado 3.1.1. *Reactivos, porógenos y sustancias*.

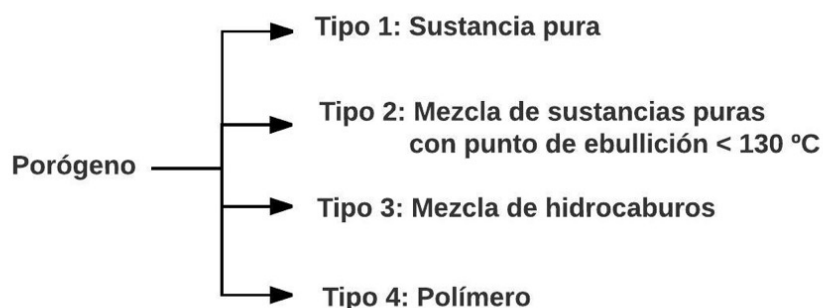


Figura 24. Naturaleza de las sustancias porogénicas empleadas.

Los porógenos de sustancias puras (porógenos puros de tipo 1) son sustancias líquidas con propiedades físico-químicas idóneas para mezclarse directamente al prepolímero, como, por ejemplo, un punto de ebullición por encima de 130 °C. En cambio, las sustancias líquidas con un punto de ebullición menor a 130 °C (tipo 2) no pudieron utilizarse puras por requerir la adición de una segunda sustancia. Esta se adiciona para aumentar la temperatura de ebullición del porógeno por encima de 130 °C y conseguir que no se evapore (incremento ebulloscópico).

Por otro lado, la mezcla de hidrocarburos (tipo 3) tiene un alto punto de ebullición y ninguna posibilidad de generar una reacción secundaria con alguno de los reactivos. El uso de polímeros fundidos o semifundidos (tipo 4) es una buena alternativa, ya que no se evaporan, y dependiendo de su temperatura de fusión, experimentarán un cambio de estado o no.

Para seleccionar los porógenos empleados en este trabajo, se ha tenido en cuenta los siguientes aspectos:

- Sustancia con una miscibilidad baja o nula con el prepolímero y generar la separación de fases que pueda dar lugar a los futuros poros.
- Grupos funcionales del porógeno distintos a los que contienen los reactivos (por ejemplo, alcoholes) para evitar reacciones secundarias con éste.
- Temperatura de ebullición, en el caso de los porógenos de tipo 1 a 3, superior a 140°C, para asegurar que no se produce la evaporación durante el proceso de curado. En el caso de polímeros, pueden ser amorfos y encontrarse en estado sólido, o semicristalinos y encontrarse en estado sólido o fundido.

Haciendo uso de los datos mostrados en las Tablas de la 6 a la 12, para cada tipo de porógeno, y de la Ecuación 5, es posible conocer la cantidad másica que se requiere de cada porógeno para una porosidad estimada dada. La porosidad se define como la fracción volúmica de poros en el andamiaje fabricado.

$$\text{Porosidad estimada (\%)} = \frac{m_1/\rho_1}{m_1/\rho_1 + m_2/\rho_2} \cdot 100 \quad \text{Ec. 5}$$

donde:

- ρ_1 y ρ_2 = densidad del porógeno y del PGS, respectivamente (g/cm^3)
- m_1 y m_2 = masa del porógeno y del PGS, respectivamente (g)

Este es un cálculo previo en el que se está considerando de manera somera los volúmenes iniciales a temperatura ambiente para tener una estimación, pero que no tiene en cuenta las densidades a 130°C, ni las alteraciones estéricas debidas al contacto porógeno-polímero. Posteriormente, para conocer las discrepancias se determina con rigurosidad la porosidad real mediante el correspondiente ensayo.

Para este cálculo, la cantidad de PGS se mantiene fija y se varían las proporciones másicas de porógeno para obtener un cierto grado de porosidad.

Para la fabricación de *scaffolds* se ha seguido el mismo protocolo de curado, pero sustituyendo el molde de teflón por viales de vidrio de diámetro entre 1,5 y 2 cm. El proceso se ha dividido en experimentos en los que varía la porosidad, y a su vez la masa de porógeno, y los que se varían los porógenos a utilizar.

El número de muestras variará en cada experimento dependiendo del número de porógenos utilizados y las réplicas producidas. De las Tablas 1.4 a la 1.10, del Anexo 1, se recogen todos los experimentos con los respectivos porógenos empleados y sus masas experimentales.

Tipo 1: Porógeno de sustancia pura

Los porógenos puros dimetilformamida (DMF) y naftaleno, se han tomado para hacer uso de la técnica de la separación de fases:

La DMF es un líquido a temperatura ambiente con un punto de ebullición de 153 °C a presión atmosférica y polar. El naftaleno es apolar y sólido a temperatura ambiente, por lo que se ha calentado por encima de su temperatura de fusión, 80 °C (Tabla 1.1, Anexo 1), para un cambio a fase líquida, y posteriormente se ha mezclado. La porosidad se fijó al 80 % para ambos y se realizaron 2 réplicas por cada experimento y porógeno.

La DMF se ensayó, en una primera experiencia, en dos viales recubiertos de papel de aluminio perforado. En una segunda experiencia, se ensayaron dos viales adicionales sin tapar. Estos fueron introducidos en un frasco hermético junto a un vial con DMF pura para generar una atmósfera saturada fija durante el curado. El frasco hermético fue utilizado para evitar que la DMF se evaporase durante el ciclo de curado.

El naftaleno se utilizó en un único experimento con dos viales tapados con papel de aluminio perforado. Previamente, este fue fundido para que cambiara a fase líquida y poder mezclarlo con el prepolímero. En la Tabla 6 se muestran las cantidades de prepolímero de PGS y de porógeno necesarias para la porosidad que se había fijado. En la Tabla 1.4 del Anexo 1, se recogen los datos experimentales obtenidos para las experiencias con cada porógeno.

Tabla 6. Datos teóricos para la separación de fases mediante porógeno tipo 1.

Porógeno	Porosidad (%)	PGS (g)	Porógeno teórico (g)
DMF	80	3	16,18
Naftaleno	80	1,5	9,94

Tipo 2: Porógeno a partir de mezcla de sustancias con punto de ebullición < 130 °C

El uso de porógenos tipo 1, con un punto de ebullición por encima de 130 °C, se vio limitado debido a la baja disponibilidad de sustancias puras que cumplan con los requisitos estipulados. Por ello, se decidió realizar un aumento ebulloscópico de una sustancia pura (A) con un punto de ebullición inferior a 130 °C con la adición de una segunda sustancia (B). Haciendo uso de la Ecuación 6, (Petrucci *et al.*, 2011), se obtiene la concentración necesaria de la sustancia B en una disolución de A:

$$\Delta T_b = K_b \cdot M \quad \text{Ec. 6}$$

donde;

- $\Delta T_b = T - T_e$, diferencia entre la temperatura deseada y la de ebullición de la sustancia A (°C)
- K_b = constante ebulloscópica sustancia A (K/(mol/L))
- M = concentración de la sustancia B en disolución de A (mol/L)

Se consideraron el 1,4-Dioxano y el n-Octano, por ser líquidos polares y sin grupos funcionales que, *a priori*, generasen reacciones secundarias con los reactivos. El primero, se desestimó porque requería una gran cantidad de una segunda sustancia, debido a que su temperatura de ebullición dista mucho de 130 °C, y su constante ebulloscópica es relativamente pequeña. Se optó, pues, por el n-Octano con

la adición de naftaleno, ya que ambos son hidrocarburos y tienen afinidad para mezclarse. Tomando los datos de la Tabla 1.1 del Anexo 1 y la Ecuación 7, se realiza el siguiente cálculo;

$$T - T_e = K_b \cdot M \quad \text{Ec.7} \rightarrow 140 (K) - 125,7 (K) = 4 \left(\frac{K}{\text{mol/L}} \right) \cdot M \left(\frac{\text{mol}}{L} \right)$$

$$M = 3,575 \text{ mol/L} = 0,179 \frac{\text{mol}}{50 \text{ mL}}$$

Por lo tanto, la masa necesaria de naftaleno para 50 ml de mezcla se calcula con la Ecuación 8:

$$m = n \cdot PM \quad \text{Ec.8}$$

$$m_{\text{Naftaleno}} = 0,179 \cdot 128,18 = 22,91 \text{ g}$$

Cabe destacar que a temperatura normal el n-Octano y el naftaleno tienen buena miscibilidad, pero debido a la cantidad de naftaleno requerida, el n-Octano se satura de este y el restante cristaliza y precipita. Para conseguir disolver homogéneamente el naftaleno, el volumen total de la mezcla puede variar debido a que la muestra se calienta a una temperatura cercana a 80 °C (temperatura de fusión del naftaleno). A su vez, la densidad de la mezcla también variará, pero a pesar de ello, ambas variaciones pueden considerarse despreciables. Por ello, se ha introducido la masa de naftaleno en un matraz aforado de 50 ml, se ha enrasado con n-octano y se ha tomado la densidad del n-octano. La masa que se obtiene de realizar los cálculos de la Ecuación 5 hace referencia a la masa de la mezcla.

Se ha realizado un experimento con dos muestras, en la que se han tomado de nuevo viales de 2 cm de diámetro. A estos, se les ha introducido la masa de porógeno y, a continuación, de prepolímero tal y como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos teóricos para la separación de fases mediante porógeno tipo 2.

Porógeno	Porosidad (%)	PGS (g)	Porógeno teórico (g)
Octano + naftaleno	80	1,5	6,03

Tipo 3: Hidrocarburo como porógeno

Al igual que los porógenos de tipo 1 y 2, los hidrocarburos cumplen todos los requisitos y es una buena alternativa posible, *a priori*, para aplicar la técnica de separación de fases. Asimismo, en estudios previos del PGS ya se ha hecho uso de esta en forma de moldes de parafina (Crapo *et al.*, 2008). Por ello, se ha optado por la parafina como porógeno tipo 3.

Las experiencias realizadas con la parafina han sido cuatro. En la primera experiencia, se ha fijado la porosidad en 80 %, y se ha incorporado el frasco hermético donde han sido introducidos dos viales con la mezcla prepolímero/parafina y un tercer vial con parafina pura. Al igual que para la DMF mencionada en el Tipo 1, se ha hecho uso del frasco para asegurar que la parafina genera una atmósfera saturada en el interior y esta no escapa. Además, se ha introducido en el horno un vial control con parafina pura para observar si esta evapora.

En la segunda experiencia, se ha mantenido el porcentaje de porosidad y se ha eliminado el frasco hermético, ya que se ha observado que la parafina no ha evaporado durante el proceso. Se han

preparado dos muestras en dos viales tapados con papel de aluminio perforado y se han introducido en el horno.

Para la tercera experiencia, se ha disminuido la porosidad a 70 %, y en la cuarta a 50 %, pero esta vez para cada experiencia se han vuelto a usar dos viales tapados con papel de aluminio perforado. Estas sucesivas modificaciones han sido motivadas por conseguir la separación de fases porque los resultados que se han ido obteniendo presentaban indicios de estar muy cerca de ser satisfactorios. Los datos teóricos de las cuatro experiencias se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Datos teóricos para la separación de fases mediante porógeno tipo 3.

Porógeno	Porosidad (%)	PGS (g)	Porógeno teórico (g)
Parafina	80	1,5	7,63
	70	1,5	4,45
	50	1,5	1,91

Tipo 4: Polímeros como porógenos

El cuarto tipo de porógeno utilizado ha sido de sustancias poliméricas, de entre las que se han ensayado hasta siete diferentes: policaprolactona (PCL), Pluronic P123, Pluronic F127, óxido de polietileno (PEO), polimetil metacrilato (PMMA), polietil metacrilato (PEMA) y alcohol polivinílico (PVA). Las masas teóricas para todos estos se recogen en la Tabla X.

En primer lugar, la PCL ha sido seleccionada por haber sido utilizada junto con el PGS en otras técnicas de fabricación de *scaffolds*, como el *electrospinning* (Sant *et al.*, 2013). La experiencia que se ha realizado con PCL ha sido con la técnica de separación de fases, puesto que la PCL tiene una temperatura de fusión de cristales de 60 °C (< 130 °C) y no existe riesgo de que se produzcan reacciones paralelas. Para ello, se ha fijado la porosidad en 80 % y se han realizan dos muestras de esta. Se ha decidido disolverla en acetona con una relación de 10 % en masa de PCL en disolución, debido a la alta viscosidad que ha presentado la PCL cuando ha sido calentada por encima de su temperatura de fusión (60 °C). La masa de acetona necesaria se puede calcular con el dato de la masa de PCL de la Tabla 9 y la Ecuación 9.

$$\frac{m_{PCL}}{m_{Actona} + m_{PCL}} = 0,1 \quad Ec. 9$$

Para ello, se ha vertido la acetona y los pellets de PCL en un vaso de precipitados de 100 ml junto con un imán. Posteriormente, se han calentado a una temperatura aproximada de 30 °C en una placa calefactora con agitación. Cabe tener cuidado con no calentar en exceso para evitar la evaporación de la acetona. Una vez se ha obtenido una mezcla líquida de PCL/acetona, se inyecta el prepolímero, se mezcla convenientemente y se tapa el vaso de precipitados con papel de aluminio perforado. La acetona se evaporará rápidamente una vez introducidos los vasos en el horno, dejando en contacto íntimo al prepolímero y la PCL.

Tabla 9. Datos teóricos para la separación de fases mediante PCL, porógeno tipo 4.

Porógeno	Porosidad (%)	PGS (g)	Porógeno teórico (g)	Acetona (g)
PCL	80	1,5	9,81	88,29

En segundo lugar, se ha hecho uso de Pluronic P123 y F127. Estos son copolímeros formados por óxido de poli(etileno), PEO, y óxido de polipropileno, PPO. Tienen una estructura en bloques simétricos de PEO-PPO-PEO. El Pluronic P123 ha sido utilizado en otras aplicaciones, como la fabricación de nanopartículas mediante la técnica sol-gel (Sigma-Aldrich, 2016b). Además, con el aumento de la temperatura, forma micelas de los tres bloques. El F127 es utilizado para la fabricación de PLGA y como marcaje fluorescente de vasos sanguíneos y neuronas (Sigma-Aldrich, 2016a)

En el caso del P123, se han realizado dos experiencias a 70% y 50% de porosidad con dos réplicas por cada experiencia. El P123 es una cera transparente a temperatura normal, por lo que una vez se ha introducido en cada vial la cantidad estipulada para cada experiencia, se ha tenido que atemperar para disminuir su viscosidad y poderse mezclar con el prepolímero. Los viales son tapados con papel de aluminio perforados. Para el F127, se ha realizado una única experiencia con dos réplicas. El F127 es un polvo blanco a temperatura ambiente que se introduce directamente en el vial y no precisa de tratamiento.

Paralelamente al Pluronic P123 y F127, se ha utilizado el óxido de polietileno, PEO, con el que se han realizado dos experiencias con dos réplicas por experiencia con porosidades de 70 % y 50 %. Este ha sido seleccionado por ser uno de los bloques que conforma a los Pluronic y tener una temperatura de fusión ligeramente inferior a la del proceso de curado. Cabe destacar que tiene un grupo OH lateral que es posible que genere alguna reacción secundaria indeseada. Los datos teóricos para estos tres porógenos de tipo 4 se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Datos teóricos para la separación de fases mediante P123, F127 y PEO, porógenos tipo 4.

Porógeno	Porosidad (%)	PGS (g)	Porógeno teórico (g)
P123	70	1,5	5,09
	50	1,5	2,18
F127	70	1,5	5,48
PEO	70	1,5	5,65
	50	1,5	2,42

En tercer lugar, se han utilizado PMMA y PEMA para la técnica de *particulate leaching*. Se han considerados estos por su disponibilidad en el laboratorio, y por haber sido empleados como porógenos de otros biomateriales. Además, son amorfos, por lo que se encuentran en estado líquido viscoso a la temperatura del proceso de curado y un tamaño de partícula de 126-150 μm y 125-180 μm , respectivamente, que son adecuados para generar poros de dimensiones en torno a 100 μm .

En la Tabla 11 se resumen todas las experiencias que se han realizado con PMMA y PEMA. Para cada experiencia, ambos polímeros han sido utilizados en paralelo con las mismas relaciones másicas de PGS/THF y porcentaje de porosidad, que se recogen en la Tabla 12.

Es decir, en las experiencias 1 y 2, el prepolímero no se ha disuelto en THF y se ha fijado una porosidad de 70 % y 50 %, respectivamente. En cada experiencia se han utilizado dos viales con PMMA y dos con PEMA. Para las experiencias 3, 4 y 5, se ha disuelto el prepolímero con una relación de THF de (70/30), y la porosidad ha variado entre el 70 %, 50 % y el 20 %. A pesar de que una porosidad estimada de 20 % es extremadamente baja, se prueba para conocer el comportamiento de estos porógenos tanto a altas como a bajas cantidades. En la experiencia 6, se ha disuelto el prepolímero con una relación (50/50) y una porosidad de 50 %.

Tabla 11. Experiencias para *particulate leaching* con PMMA y PEMA, porógenos tipo 4.

Porógeno		Experiencia	PGS/THF	Porosidad (%)
PMMA	PEMA	1	0	70
		2	0	50
		3	70/30	70
		4	70/30	50
		5	70/30	20
		6	50/50	50

Tabla 12. Datos teóricos para *particulate leaching* con PMMA y PEMA, porógenos tipo 4.

Porógeno	Porosidad (%)	PGS (g)	Porógeno teórico (g)	THF (g)
PMMA	70	1,5	5,95	0/0,45
	50	1,5	2,55	0/0,45
	20	1,5	0,64	0,45
PEMA	70	1,5	7,55	0/0,45
	50	1,5	3,24	0/0,45
	20	1,5	0,81	0,45

Para inyectar el prepolímero, como se ha expuesto, en algunas experiencias se ha hecho de forma directa mediante una pipeta Pasteur, y en otras se ha disuelto el prepolímero en THF para disminuir su viscosidad. En este caso, el THF ayuda al prepolímero a mezclarse y/o fluir entre el porógeno, pero una vez introducida la muestra en el horno, el THF se evapora rápidamente (su temperatura de ebullición es de 65 °C). Para ello, en un vaso de precipitados adicional, se ha pesado la cantidad de THF necesaria dependiendo de la relación PGS/THF, y a continuación, se ha adicionado el prepolímero. Se ha agitado vigorosamente la mezcla para finalmente inyectarse en el vial junto al porógeno.

Por último, se ha utilizado a modo de control y comparación con las técnicas anteriores, un molde circular de 5 cm de diámetro fabricado por otro investigador del CBIT en alcohol polivinílico, PVA mediante una impresora 3D modelo *BfB Touch Dual Head-Smoke Case*. Este ha sido diseñado con una morfología de malla sin fusión de los nódulos, donde las capas horizontales y capas verticales están constituidas por hilos ortogonales, a modo de rejilla.

Para la inyección del prepolímero, el molde ha sido colocado en una placa Petri y el prepolímero ha sido disuelto con una relación de THF/prepolímero (70/30), para conseguir que el prepolímero fluya entre todos los recovecos del molde y penetre en su totalidad. El conjunto se ha tapado con papel de aluminio perforado.

En todas las experiencias se generarán residuos peligrosos y no peligrosos la hora de preparar los moldes con sus respectivos porógenos. La gestión de estos se describe en el apartado 2. *Normativa*.

Una vez preparadas las combinaciones prepolímero-porógeno, en los casos que se tapan con film de aluminio, se perfora para facilitar la salida de vapores que se generen en el curado. Con esto las muestras están listas para su curado y se introducen en el horno, Figura 14, durante 48 horas a 130 °C.

Transcurrido el tiempo, se retiran del horno haciendo uso de los guantes térmicos y se depositan sobre el banco de trabajo para que se acondicionen.

4.5.4. Protocolo de lavado y secado de *scaffolds* de PGS

El lavado de las muestras se ha realizado mediante el montaje mostrado en la Figura 14. En primer lugar, las muestras se han extraído de los viales que las contienen. Si no ha sido posible, se ha roto el vial con la ayuda de una maza, teniendo especial cuidado de no dañarlas.

Las muestras se han envuelto en cada caso en una malla de nylon firmemente cerrada. El montaje se encuentra listo, por tanto, se han introducido en el interior del matraz esférico las muestras junto con la acetona y partículas cerámicas para el control de borboteo. La acetona generara un intercambio solido/líquido en el interior de la muestra, disolviendo el porógeno y rellenando los poros del *scaffold*. El *scaffold* sufre un ligero hinchado a causa del contacto con la acetona.

Se ha unido el matraz al serpentín, aplicando vaselina en la parte de contacto para evitar fugas, y se cierra con la palometa. Se conecta la bomba del circuito de condensación y la manta calefactora. Para conseguir extraer todo el porógeno se ha necesitado un total de 18 horas, aproximadamente, repartidas en tres ciclos de 6 horas con una renovación de la acetona en cada ciclo. La temperatura de la acetona en el matraz se mantendrá constante a 56 °C debido al equilibrio líquido-vapor que se mantiene entre la fase líquida y acetona que se evapora, que se condensa en el serpentín y retorna al matraz.

En el caso del *scaffold* fabricado en PVA por impresión 3D, se realiza el mismo procedimiento, pero se sustituye la acetona por agua destilada, ya que el PVA se disuelve mejor en esta. Se realiza durante un total de 16 horas, aproximadamente, en ciclos de 4 horas con renovación del agua destilada en cada ciclo.

Una vez transcurridas las 16 horas en ambos casos, se detiene el ciclo de lavado. Cuando cesa el borboteo, se abre la palometa, se extraen las muestras y se depositan en el banco de trabajo sobre papel absorbente. Posteriormente, se sacan las muestras de la malla de nylon y se introducen en bolsas herméticas rotuladas y perforadas para que la acetona pueda evaporarse pausadamente del *scaffold* durante 24 horas, ya que una extracción rápida puede generar grietas y dañar la estructura porosa.

Una vez ha evaporado prácticamente la totalidad de la acetona, las muestras se disponen en placas Petri y se llevan a un desecador de vacío, mostrado en la Figura 18. En este se hace el vacío hasta una depresión mínima de -70 cmHg durante aproximadamente 10 minutos, lo que consigue extraer el resto de la acetona, o agua, que pueda quedar en los recovecos de la estructura porosa. Con esto se asegura que las muestras están totalmente secas y preparadas para los ensayos de caracterización.

4.5.5. Ensayos de caracterización de *scaffolds* de PGS

4.5.5.1. Ensayo de microscopía electrónica de barrido, SEM

El fundamento del sistema SEM consiste en hacer incidir un haz de electrones finamente enfocados sobre la muestra, esta emite una señal que puede ser registrada mediante un tubo de rayos catódicos en una pantalla. El utilizado se muestra en la Figura 16, y pertenece al Servicio de Microscopía de la UPV, siendo los componentes principales del SEM:

- La fuente de energía, donde los parámetros más importantes son el voltaje de aceleración, la intensidad de corriente y el diámetro del haz,
- portamuestras, soporte donde se alojan las muestras a visualizar, y
- un sistema de ampliación, que recoge las señales y procesa la información que procede de la muestra al mismo tiempo que el haz de electrones barre la muestra.

El ensayo de microscopia electrónica ha seguido el siguiente procedimiento. En primer lugar, se han cortado las muestras de dos modos, con cuchilla y por fractura en frío. El corte mediante cuchilla se ha realizado haciendo una incisión transversal de las muestras de sección cilíndrica y una segunda incisión transversal de la porción obtenida.

Para el corte en frío se ha utilizado nitrógeno líquido. Se ha realizado la primera incisión longitudinal de la muestra con la cuchilla, y seguidamente se ha introducido ésta en un recipiente con nitrógeno líquido. Por último, con la ayuda de dos pinzas, se ha roto por la mitad. Este corte mediante fractura frágil proporciona una mejor visión de la estructura original del material sin seccionar, ya que con la cuchilla es sencillo producir deformaciones indeseadas al material.

Como se han obtenido dos piezas cilíndricas de cada muestra, se han cortado dos porciones (una con cuchilla y una en frío) de cada una. En el caso del *scaffold* 3D, el corte en frío no se ha podido conseguir realizar satisfactoriamente, por lo que se ha cortado una porción con cuchilla. Estas porciones se han adherido a los portamuestras metálicos mediante una cinta especial de carbono.

En último lugar, antes de introducirse las muestras en el equipo, se ha precisado de una pulverización de átomos de oro sobre la superficie de los fragmentos a observar mediante un equipo de pulverización que trabaja a vacío y con atmósfera de Argón. Los átomos de oro se depositan sobre la

superficie del material poroso no conductor de modo que en aquellas zonas donde se han generado cavidades, este se introducirá. Así, se logra que los electrones proyectados por el microscopio electrónico colisionen sobre los átomos superficiales de oro, para incrementar la señal del detector. Los portamuestras junto con las muestras tras este tratamiento se pueden observar en la Figura 25.



Figura 25. Portamuestras cilíndricos con las muestras tratadas con oro colocadas en los laterales, para poder observar su sección.

Una vez preparadas las muestras, se han introducido en el interior del Microscopio electrónico. Los parámetros principales de la fuente de energía se fijan en 15 KV. Para cada porción y dependiendo de la estructura observada, se han realizado fotografías a los siguientes aumentos: 50x, 200x y 500x.

4.5.5.2. Ensayo de densidad y porosidad

El ensayo de densidad y porosidad de un material está fundamentado de manera teórica a partir de la estática de fluidos. Se realiza mediante una pesada hidrostática, basándose en el principio de Arquímedes, en el cual se consideran las fuerzas que actúan sobre un material cuando se encuentra sumergido en el seno de un líquido, como se observa en la Figura 26.

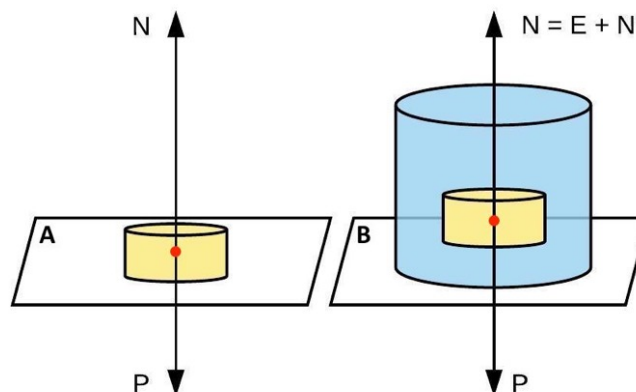


Figura 26. Estática de fluidos de un cuerpo sumergido en un fluido.

Hay que destacar que las muestras a ensayar son porosas y no macizas, Figura 27, por lo que tienen un volumen aparente, Ecuación 11. Por ello, previo a la inmersión en el fluido, la muestra porosa debe ser inyectada de este para rellenar el volumen de poros que posee.

$$V_{aparente} = V_{scaffold} + V_{poros} \quad Ec. 11$$

$$V_{scaffold} = \frac{m}{\rho} \quad V_{poros} = \frac{m_i - m}{\rho_f} \quad Ec. 12$$

$$V_{ap} = \frac{m}{\rho} + \frac{m_i - m}{\rho_f} \quad Ec. 13$$

donde:

- m = masa del *scaffold* con los poros vacíos (g),
- m_i = masa del *scaffold* con los poros llenos de fluido (g),
- ρ = densidad del *scaffold* (g/cm³) y,
- ρ_f = densidad del fluido (g/cm³).



Figura 27. Scaffolds con los poros A) vacíos y B) llenos de fluido.

Según el principio de Arquímedes, un cuerpo sumergido en el seno de un fluido experimenta un empuje (E) igual al peso del volumen del fluido desalojado, Ecuación 15. Y aplicando la segunda ley de Newton o ley fundamental de la dinámica, se obtiene la Ecuación 14. El cuerpo A de la Figura 27 se encuentra al aire, por lo que considera un empuje despreciable. El cuerpo B se encuentra sumergido en el seno de un fluido en reposo, por tanto:

$$\sum F_V = 0 \quad \rightarrow \quad E + N' = P = m_i \cdot g \quad Ec. 14$$

$$E = m_f \cdot g = \rho_f \cdot V_{ap} \cdot g \quad Ec. 15$$

$$N' = m_s \cdot g \quad Ec. 16$$

Sustituyendo la Ecuación 15 y 16 en la 14, se tiene:

$$\rho_f \cdot V_{ap} \cdot g + m_s \cdot g = m_i \cdot g \quad Ec. 17$$

Se sustituye la Ecuación 13 en la 17, y se obtiene:

$$\rho_f \cdot \left(\frac{m}{\rho} - \frac{m_i - m}{\rho_f} \right) \cdot g + m_s \cdot g = m_i \cdot g \quad \rightarrow \quad \rho_f \cdot \left(\frac{m}{\rho} - \frac{m_i - m}{\rho_f} \right) + m_s = m_i \quad Ec. 18$$

Por tanto, de la Ecuación 18 se puede despejar la densidad del material como:

$$\rho = \frac{m}{m - m_s} \cdot \rho_f \quad Ec. 19$$

donde:

- m_s = masa del *scaffold* sumergido en el fluido con los poros rellenos del mismo fluido (g),
- m = masa del *scaffold* con los poros vacíos (g),
- ρ_f = densidad del fluido (g/cm^3).

Para dar comienzo al ensayo, previamente se han cortado tres porciones de cada muestra con unas dimensiones aproximadas de 1 cm de largo por 4 mm de alto y han sido rellenos tres viales de n-Octano. Una vez preparadas, el procedimiento experimental se ha realizado empleando el montaje de la Figura 17. En primer lugar, la muestra se ha depositado en el plato superior de la balanza y se ha anotado su masa (m). Seguidamente se ha introducido en el vial y se ha sumergido en n-octano para forzar al relleno de los poros en un desecador de vacío. Se genera el vacío durante 3 minutos.

De nuevo en la balanza, la muestra es extraída del vial, teniendo especial cuidado en no apretarla para no extruir el fluido del interior, y es depositada en el plato superior. Anotada la masa (m_i), se introduce en el plato inferior inmersa en el vaso con n-Octano y se anota su masa (m_s).

Con los datos obtenidos se puede, a continuación, calcular la porosidad de la muestra que viene dada por la relación de volúmenes siguiente:

$$\pi = \frac{V_{poros}}{V_{ap}} \quad Ec. 20$$

Despejando de la Ecuación 17 se obtiene el volumen aparente como:

$$V_{ap} = \frac{m_i - m_s}{\rho_f} \quad Ec. 21$$

Por lo tanto, sustituyendo en la Ecuación 20 la 12 y 21 se obtiene la porosidad, π , como:

$$\pi = \frac{m_i - m}{m_i - m_s} \quad Ec. 22$$

Una vez finalizada la experiencia, las muestras ensayadas se introducen en una bolsa hermética y se desechan al contenedor de residuos sólidos para su gestión.

4.5.5.3. ENSAYO MECÁNICO DE COMPRESIÓN PARA EL ANÁLISIS DE MODULO ELÁSTICO

El ensayo mecánico de compresión se ha realizado para analizar el comportamiento elástico, y por tanto, conocer el módulo elástico (módulo de Young) de las muestras fabricadas. El equipo utilizado ha sido el mostrado en la Figura 19, compuesto por un vástago, mostrado en la Figura 20, responsable de aplicar una fuerza de compresión sobre el material de forma progresiva durante el tiempo estipulado. La deformación que experimenta el material se registra junto con la tensión ejercida por el vástago en función del tiempo. Con esto, se consigue representar un gráfico tensión-deformación y conocer el módulo de Young de la muestra.

Para realizar el ensayo se han troquelado para cada muestra cuatro réplicas con unas dimensiones de 2 mm de alto, en el caso de los *films*, y unos 4 mm de alto para los *scaffolds*, por 5 mm de diámetro en

ambos casos. De todos modos, la altura exacta la mide y registra automáticamente el equipo antes de dar comienzo el ensayo, para así asegurar que el vástago está en pleno contacto y aplica toda la carga sobre esta.

4.5.5.4. ENSAYO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

El ensayo de cromatografía de gases se ha realizado con el cromatógrafo Agilent Technologies 7820A mostrado en la Figura 21. Este está compuesto por un horno que en su interior se aloja una columna por la que pasarán los compuesto de la muestra en fase gas. Los pesos moleculares de estas determinarán la velocidad con las que son captadas por el receptor. Las sustancias a analizar no deben exceder un peso 1kDa y se disuelven en acetona para poder ser ensayada y evitar que este no se sature debido a la alta resolución que posee. Para ello, se pipetea 1 ml de la muestra problema en un vial especial para cromatografía con acetona y se introduce en el equipo. Haciendo uso del software del equipo se ha podido comparar los datos obtenidos con la base de datos que posee y determinar el porcentaje de probabilidad que existe de que la muestra analizada corresponda con la obtenida. Cabe destacar que este ensayo solo se ha realizado para muestras líquidas de las que no se conocía su composición por algún posible cambio químico durante el proceso de curado del prepolímero de PGS.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizadas las experiencias de fabricación de *films* y de *scaffolds*, se confirma que el RDTA optimizado ha logrado funcionar correctamente y obtener el prepolímero de PGS. Dado que en todas las experiencias se ha obtenido un prepolímero con características similares, no existen evidencias de que se hayan dado cambios significativos con respecto al estándar, salvo en el aumento de la producción. Estas evidencias se analizarán en estudios futuros para resolver las dudas de si existe alguna modificación química.

Esta evolución del protocolo de prepolimerización supera las limitaciones en la transmisión de calor hacia los reactivos del protocolo estándar y abre el abanico de posibilidades para la producción del prepolímero. Estas posibilidades se pueden desarrollar en estudios posteriores de reactores que trabajen en continuo o semicontinuo para una producción constante a escala industrial. Con esta optimización del proceso, se han obtenido los resultados que se presentan y discuten a continuación.

En primer lugar, se muestran los *films* control obtenidos por el proceso de prepolimerización estándar (A) y optimizado (B), Figura 28. Esta experiencia se ha realizado para poder comparar el funcionamiento del RDTA optimizado respecto del estándar e implantarlo en el proceso. Como se observa, a priori, no existen diferencias entre el *film* A, y el *film* B en cuanto a textura, consistencia y apariencia. Se ha tomado el protocolo optimizado como protocolo para realizar todas las experiencias posteriores. En ensayos posteriores se aportan más evidencias que corroboran la similitud de ambos productos.

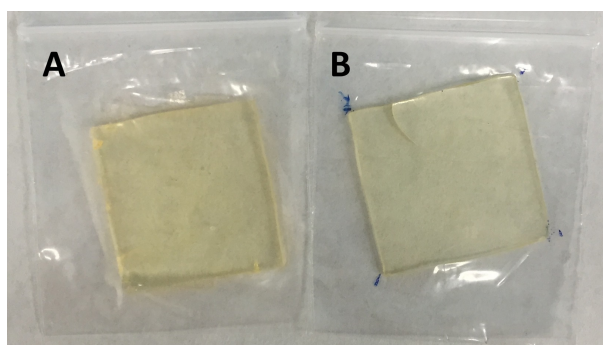


Figura 28. *Film* fabricado por el protocolo A) estándar y B) optimizado.

Tipo 1: Porógeno de sustancia pura

En la primera experiencia realizada con DMF con porosidad aparente de 80 %, se han obtenido viales que contienen una pequeña *capa/film* de PGS entrecruzado transparente, pero ningún rastro de la DMF tras el curado. Este fenómeno ha ocurrido a pesar que la DMF tiene una temperatura de ebullición superior a la temperatura de curado. Se cree que esto ha sucedido debido a que los viales estaban abiertos a la atmósfera y la DMF se ha evaporado lentamente para conseguir el equilibrio de potenciales químicos entre la fase líquida polímero/DMF y la fase gaseosa del aire del interior del horno. Este equilibrio no se ha conseguido porque el horno trabaja con renovación de aire constante, por lo que la fracción másica de la DMF que ha podido pasar al ambiente hasta compensar la presión

de vapor de esta a 130 °C ha ido sustituyéndose por aire renovado durante las 48 horas del proceso de curado, tiempo suficiente para que todo el disolvente se pierda presumiblemente.

Para la segunda experiencia, debido al resultado insatisfactorio de la primera, se ha utilizado un frasco hermético para descartar la evaporación de la DMF al ambiente y generar un ambiente saturado de esta en fase gas. De nuevo se ha obtenido un resultado no deseado: la DMF ha permanecido en los viales con prepolímero pero este no ha conseguido generar los entrecruzamientos entre cadenas en presencia del disolvente. Es probable que esto haya ocurrido por la abundante cantidad de DMF en relación con el prepolímero, que puede haber minimizado la probabilidad de que las cadenas se encontrasen para conseguir generar el enlace. Como se muestra en la Figura 29, se han obtenido viales con una mezcla líquida polímero/DMF.

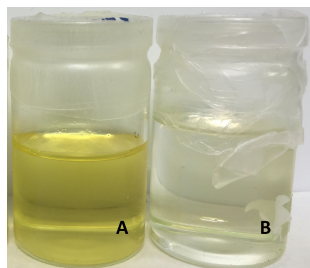


Figura 29. Viales de la experiencia con A) mezcla PGS/DMF y B) DMF pura de la experiencia 2 tras el curado.

Además, el vial de la DMF pura ha sufrido una leve coloración amarillenta, que puede deberse a alguna modificación en su composición o estructura. Por ello, se ha realizado el ensayo de cromatografía de gases mediante el cromatógrafo Agilent Technologies 7820A mostrado en la Figura 21. El ensayo se ha realizado con la DMF pura tras el proceso de curado (muestra B, y DMF pura por separado. Para cada muestra se ha disuelto 1 ml de esta en acetona y se ha inyectado. Tras el ensayo, el *software* del cromatógrafo muestra los gráficos que se observan en las Figuras 30.

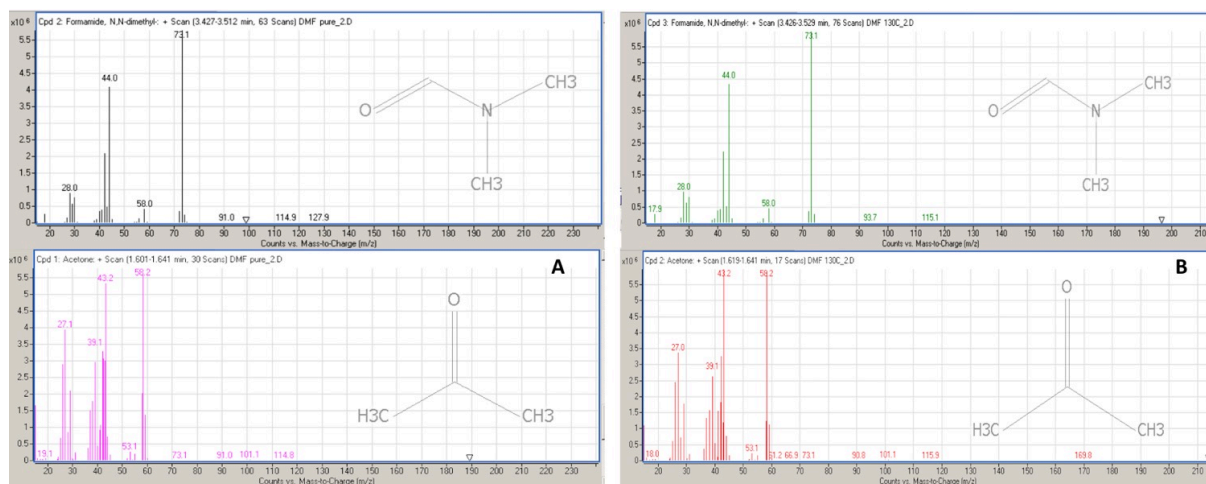


Figura 30. Gráficos cromatográficos de la muestra de A) DMF pura sin proceso de curado, B) DMF pura tras el proceso de curado.

Una vez conocidos los picos para cada muestra se han comparado con los patrones que dispone el *software* y se ha podido comprobar que se trata de DMF con un 99,1 % y 99,04 % de probabilidad en el caso de la muestra B y la pura, respectivamente. Además, muestra la acetona como segunda sustancia que contiene la muestra inyectada. Este recurso de química analítica se usó porque se sospechaba que pudieran haberse dado reacciones paralelas entre la DMF y algún otro elemento como el oxígeno del ambiente o PGS. Con el PGS no se esperaba que existiera reacción secundaria, y esta es una evidencia de que no ha ocurrido, sino que la DMF estaba generando un impedimento estérico para formar el entrecruzamiento.

Por tanto, se puede concluir que la DMF no ha sufrido ninguna modificación en su estructura y no existe la presencia de otra sustancia en su composición. Cabe destacar que este recurso no ha podido ser usado para el resto de muestras líquidas debido a que no se puede inyectar sustancias con un peso molecular superior de 1 kDa.

En la experiencia con naftaleno como porógeno al 80 %, Figura 31, se esperaba que este fuera un buen porógeno, pero tras el proceso de curado este ha generado dos zonas de distinta tonalidad debido a una separación de fases macroscópica. Esta separación en dos fases es probable que se haya dado porque a 130°C la viscosidad del naftaleno era suficientemente baja como para que se separasen antes de que curara el PGS. Este es un resultado insatisfactorio, ya que además ha presentado una coloración de la mezcla de la que se desconoce la causa, ya que el naftaleno fundido tiene un color blanquecino y el PGS curado una tonalidad amarilla.

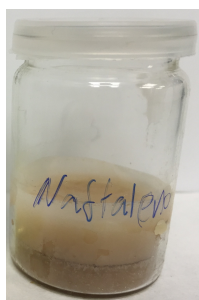


Figura 31. Muestra de mezcla entre naftaleno y PGS para la técnica de separación de fases con porosidad estimada de 80 %.

Tipo 2: Porógeno a partir de mezcla de sustancias con punto de ebullición < 130 °C

La experiencia realizada con la mezcla a 80 % de porosidad estimada de n-Octano y naftaleno disuelto en este, ha resultado un tanto complicada por la dificultad de conseguir una mezcla homogénea estable entre ambos durante todo el proceso, desde la mezcla con el prepolímero hasta el final del proceso de curado de 48h. El resultado obtenido se muestra en la Figura 32. Por lo observado, el octano se ha debido evaporar durante el proceso dejando una mezcla de PGS con naftaleno de color pardo, al igual que en la experiencia con el naftaleno puro. Esta evaporación ha provocado un resultado no deseado.



Figura 32. Muestra de la experiencia de naftaleno con n-octano y PGS para la técnica de separación de fases con porosidad estimada de 80 %.

Una de las alternativas planteadas a este suceso es el uso de un frasco hermético; por ello se hace uso de la ecuación de Antoine, Ecuación 23, y así conocer la presión de vapor del n-octano a 130 °C.

$$\log_{10} P_{vap} = A - [B/(T + C)] \quad Ec. 23$$

donde:

- P_{vap} = presión de vapor (bar)
- A = 4.05075, B = 1356.360 °C, C = 209.635 °C para en n-octano (Poling *et al.*, 2006)
- T = temperatura (°C)

De la Ecuación 23 se obtiene un valor de la presión de vapor del n-octano de 1,141 bar ligeramente superior a la presión atmosférica, 1,013 bar. A pesar de que no es una presión excesiva, se ha desestimado esta alternativa para evitar riesgos. Sirva de ejemplo que un aumento accidental y puntual de 10 °C en el interior del reactor produciría un incremento del 30.08% en la presión de la fase gaseosa, lo que supondría suponer un riesgo elevado al trabajar con elementos calientes y material de vidrio.

Tipo 3: Hidrocarburo como porógeno

Los resultados obtenidos de las experiencias realizadas aplicando parafina como porógeno han resultado insatisfactorios. En la primera experiencia, los viales son introducidos en un frasco hermético, Figura 33. Los dos viales que contienen la mezcla prepolímero-porógeno, mostrados en detalle en la Figura 34, muestran dos fases diferenciadas: parafina en la parte superior, y en el fondo se aprecia cómo el prepolímero está en forma de líquido viscoso. Esto se debe a que, como ha ocurrido con la DMF, la parafina ha generado un impedimento estérico entre las cadenas del prepolímero y una separación de fases antes de que el PGS curara. Por ello no se ha conseguido generar una red tridimensional consistente en presencia del porógeno.

Por otro lado, la parafina pura que ha sido introducida en el horno con un vial tapado con papel de aluminio perforado, ha permanecido sin evaporar tras el proceso de curado.

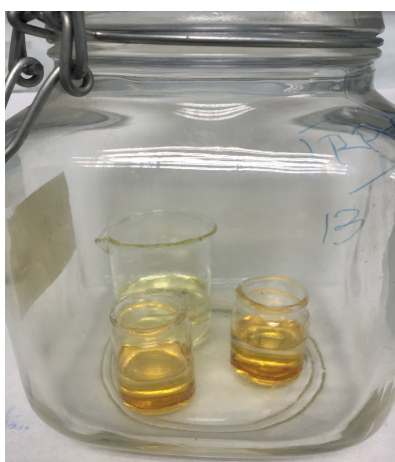


Figura 33. Muestra de la experiencia con frasco hermético de PGS y parafina.

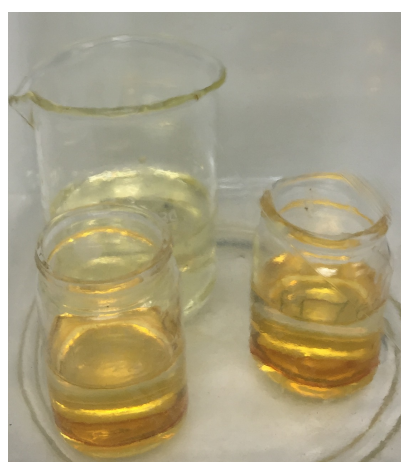


Figura 34. Viales en detalle de PGS curado en presencia de parafina.

En las tres experiencias restantes, llevadas a cabo con los viales abiertos al aire, la parafina ha permanecido en el vial sin evaporar, pero el prepolímero ha seguido sin conseguir el entrecruzamiento necesario entre cadenas para generar la matriz porosa debido de nuevo al impedimento estérico generado, puesto que el producto resultó ser líquido a temperatura ambiente. Ahora bien, en estos casos, como se aprecia en la Figura 35, no se ha producido una separación de fases heterogéneas diferenciable entre parafina y PGS curado.

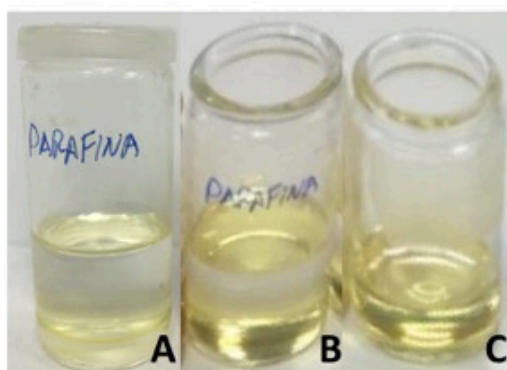


Figura 35. Muestras de la A) experiencia 2. B) experiencia 3 y C) experiencia 4, de PGS con parafina como porógeno.

Tipo 4: Polímeros como porógenos

En la experiencia con PCL disuelta en acetona y porosidad estimada de 80 %, el resultado obtenido ha sido una masa consistente con una apariencia blanquecina y ligeramente amarilleada. A priori, parecía que se había conseguido el entrecruzamiento del prepolímero por el débil color amarillo. Pero cuando se ha aplicado acetona para disolver de nuevo la PCL y obtener el *scaffold* de PGS, aunque parecía un buen resultado, en realidad las cadenas de PGS no estaban entrecruzadas. Esto ha sucedido porque las cadenas de PGS se difundieron en la acetona cuando la PCL se disuelve. Por tanto, la PCL al parecer era el elemento que mantenía el bloque sólido a temperatura ambiente, obteniéndose una pasta blanca y PGS sin entrecruzar.

Para las experiencias con Pluronic P123 y F127, se pueden observar las muestras en la Figura 36, donde se muestra que de nuevo se obtienen mezclas líquidas entre polímero-porógeno. Al igual que ha ocurrido con el naftaleno, estos polímeros a la temperatura de curado tienen una viscosidad baja, lo que hace que el prepolímero se separe en fases prematuramente y además no se consiga el entrecruzamiento entre cadenas para formar la red tridimensional. A esto se le suma la baja probabilidad de que se encuentren las moléculas, y por ello, se decide el descenso de la porosidad estimada de 70 % a 50 %.

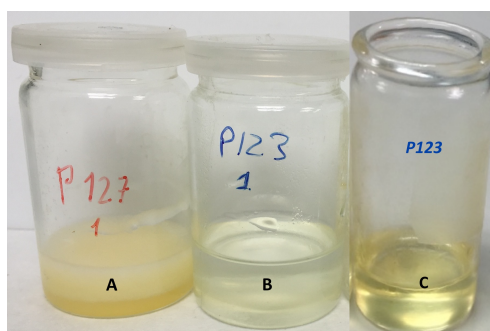


Figura 36. A) Réplica 1 de F127. B) Réplica 1 de la experiencia 1 de P123.
C) Replica 1 de la experiencia 2, PGS con F127 y P123 como porógenos.

Las experiencias con PEO han dado como resultado un sólido pardeado. Cuando se optó por este porógeno se estudió si cabía la posibilidad de generar reacciones secundarias con el ácido sebácico por contener grupos OH. La cantidad de estos disminuyen en número cuanto más alto es el peso molecular del PEO. El PEO utilizado tiene un PM bajo, 100.000 (g/mol), en comparación con otros que pueden llegar hasta los 400.000 (g/mol). Por tanto, la presencia de OH por unidad de repetición es suficientemente alta como para que se generaran reacciones secundarias que pudieran alterar parcialmente el curado del PGS, ya que es posible que los grupos del AS tuviera preferencia por estos que a los del glicerol restante. Esto puede dar lugar a mezclas desconocidas y un polímero final muy entrecruzado. En la Figura 37, y se observan las muestras obtenidas con un resultado insatisfactorio.

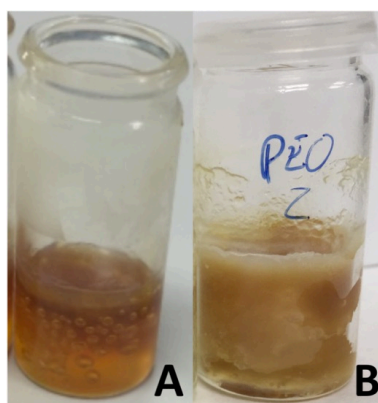


Figura 37. A) Réplica 1 de la experiencia 1.
B) Réplica 2 de la experiencia 2, PGS con PEO como porógeno.

A continuación, se observan, en las Figuras 38 y 39, las muestras para las experiencias realizadas de la técnica *particulate leaching* con esferas de PEMA de un diámetro de 125-180 μm . Las muestras A y B con porosidad estimada de 70 %, sin THF y con (70/30), respectivamente, se han desestimado por no

haber conseguido el PGS embeberse en la matriz de porógeno por completo, por la altísima viscosidad de este al intentar realizar la mezcla prepolímero-PEMA. En las muestras C, E y F, se puede observar cómo el THF ha generado un burbujeo al evaporar durante el proceso de curado, seguramente debido de nuevo a la alta viscosidad de la mezcla. La parte inferior de estas (la no afectada por las burbujas) junto con la muestra D, tienen consistencia sólida, y un color acorde a la tonalidad que presenta el PGS entrecruzado. Aun así, no han superado el proceso de lavado con acetona: las bolsas de nylon que las contenían fueron extraídas del montaje de reflujo vacías, y la acetona presentaba una evidente turbidez, por lo que el PGS resultante no estaba bien entrecruzado, porque de lo contrario no se hubiera disuelto conjuntamente con el PEMA.

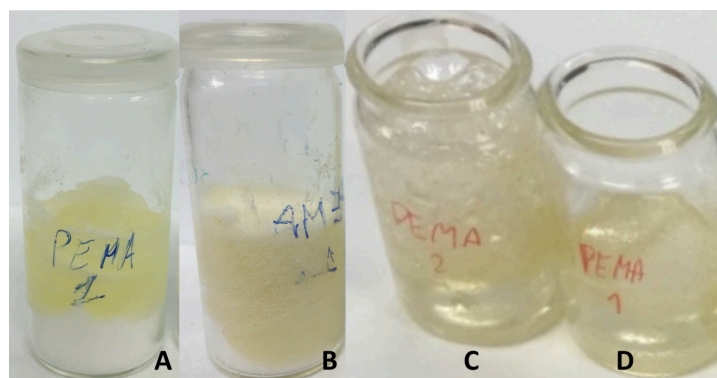


Figura 38. Réplica A) de la experiencia 1, B) de la experiencia 3, C) de la experiencia 4 y D) de la experiencia 2 de fabricación de *scaffolds* con PEMA.

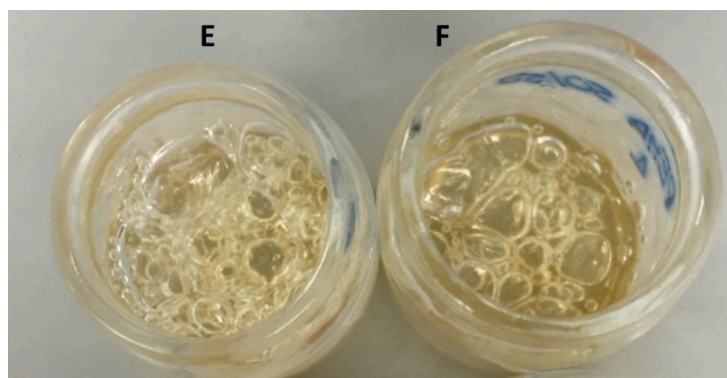


Figura 39. Réplica E) de la experiencia 5 y F) de la experiencia 6 de fabricación de *scaffolds* con PEMA.

Al igual que las muestras A y B de PEMA, las muestras A y B (70 %) de la Figura 40 han sido obtenidas por la técnica de *particulate leaching* con esferas de PMMA con un diámetro de 126-150 μm . Estas han sido desestimadas por no haberse embebido totalmente el prepolímero entre las esferas de PMMA. Esto es debido, de nuevo, a la gran cantidad de porógeno utilizado y a la viscosidad que presenta el prepolímero. En la muestra C, con menor porosidad estimada (50 %), el prepolímero ha conseguido envolver a toda la masa de porógeno, pero no ha sido capaz de penetrar entre las esferas de este. Por ello, se ha lavado en el reflujo para eliminar el PMMA y conocer la estructura que ha adoptado el PGS entrecruzado. El resultado obtenido, como se observa en la Figura 41, es una masa blanda y sin forma. Las muestras obtenidas de la experiencia 5 tenían una apariencia muy similar tras el proceso de curado

y de lavado, aunque no era lo esperado para una porosidad estimada de 20% , ya que la cantidad de porógeno es muy baja.

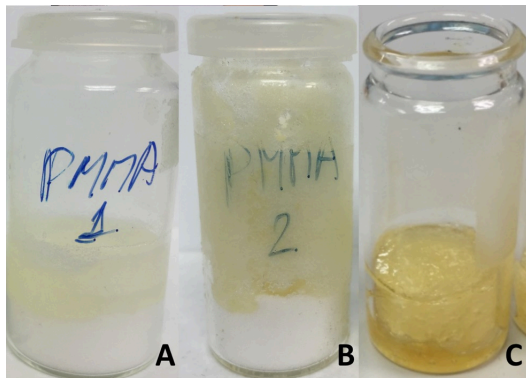


Figura 40. Réplica A) de la experiencia 1, B) de la experiencia 3 y C) de la experiencia 2 de fabricación de *scaffolds* con PMMA.



Figura 41. Muestras de la experiencia 2 con PMMA tras el proceso de lavado.

Las muestras D y E, mostradas en la Figura 42, han presentado una consistencia y apariencia como se esperaba, ya que está todo el porógeno embebido de polímero, no se han generado burbujas por la evaporación del THF y no se observan residuos viscosos de la prepolímero sin reaccionar. Por otro lado, a pesar de tener diferente relación PGS/THF, las muestras tienen aspectos similares. Esto es un factor positivo, ya que el THF ha conseguido evaporarse correctamente en ambos casos, y sin producir grandes poros en las capas superiores debidos al burbujeo. Por tanto, las réplicas obtenidas de las experiencias 4 y 6, se les ha realizado el protocolo de lavado con acetona para eliminar el PMMA y conocer la estructura resultante de PGS entrecruzado.

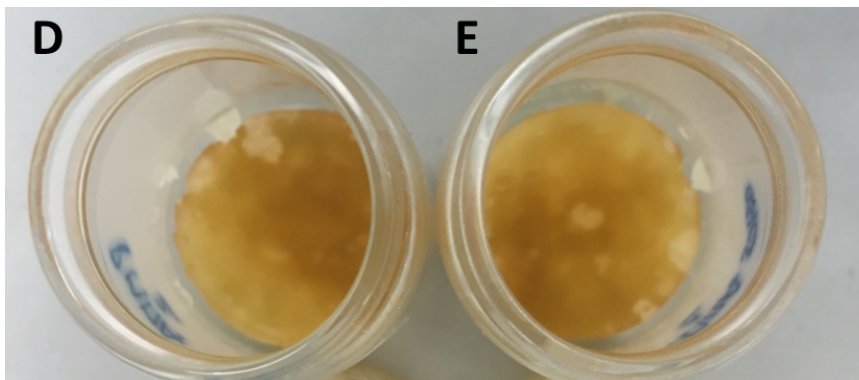


Figura 42. Réplica D) de la experiencia 4 y E) de la experiencia 6 de fabricación de *scaffolds* con PMMA.

En la Figura 43 se muestran dos réplicas de la experiencia 6, 50 % porosidad estimada y THF (50/50) tras el proceso de lavado. En la muestra de la derecha, se pueden distinguir dos regiones de distinta tonalidad. La región inferior parcialmente amarillenta, todavía contiene una abundante cantidad de acetona en su interior respecto a la región superior, o la muestra de la izquierda. Tras el proceso de secado, estas han disminuido su volumen debido a que la acetona que se alojaba en el interior las hinchaba. En la Figura 44 se muestra una de las réplicas de la experiencia 4 donde la acetona remanente en el interior de los poros ha sido evaporada trascurridas 24 horas desde que se ha

realizado el lavado. En esta se puede observar cómo, a diferencia de las muestras de la experiencia 6, la muestra tiene una zona amarilla. Esto ha sucedido a causa de que la relación de PGS/THF utilizada ha sido de (70/30) y por tanto una menor cantidad de disolvente, lo que ha hecho que el prepolímero tuviera mayor dificultad de fluir entre las partículas del porógeno y se aglomerara en esta zona. Por último, las muestras secas obtenidas se han llevado al desecador de vacío para extraer la poca acetona y humedad que podía quedar en el interior. Tras el secado, las muestras son aptas para su caracterización.



Figura 43. Réplicas de la experiencia 6 tras el proceso de lavado.



Figura 44. Réplica de la experiencia 4 tras 24 horas del proceso de lavado.

La técnica de *porogen leaching* realizada con la plantilla porogénica fabricada en PVA con impresora 3D ha dado como resultado un disco circular compacto de PVA y PGS. Para conocer la consistencia del entrecruzamiento del PGS de la muestra se ha realizado el proceso de lavado con agua ya que, como ya se ha justificado anteriormente y a diferencia del resto de porógenos, el PVA se disuelve con facilidad en este disolvente. El resultado ha sido satisfactorio, pero como se muestra en la porción en la Figura 46, el negativo de la plantilla obtenido ha tomado un color pardo no esperado que se puede deber a reacciones secundarias con grupos alcohol del PVA. A pesar de ello, el *scaffold* ha adoptado una correcta estructura porosa tridimensional de la plantilla en forma de rejillas perpendiculares superpuestas. Tras 24 horas del proceso de lavado, la muestra se ha introducido en el desecador de vacío para eliminar toda el agua remanente y dejar la muestra seca para los ensayos de caracterización. Esta técnica se ha utilizado para comparar las diferencias estructurales que se obtienen respecto de la separación de fases y *particulate leaching*.



Figura 45. Porción del *scaffold* de PGS obtenido por plantilla porogénica de PVA.

5.1. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN.

Una vez fabricados y preparados los *films* y los *scaffolds*, se les ha realizado los ensayos de caracterización para conocer sus propiedades estructurales y mecánicas. Las muestras fabricadas se han clasificado en:

- *Films* fabricados por el protocolo estándar, *FilmsE*,
- *Films* fabricados por el protocolo optimizado, *FilmsO*.
- *Scaffolds* fabricados por *particulate leaching* con PMMA en condiciones de:
 - A. porosidad estimada 50 % y relación de THF (50/50) (*ScaffoldA*),
 - B. porosidad estimada 50 % y relación de THF (70/30) (*ScaffoldB*).
- *Scaffold* fabricado por plantilla porogénica (*Scaffold 3D*).

Los *films* tan solo han sido testados en el ensayo de compresión, ya que carece de sentido realizar el ensayo de microscopía y de porosidad como en el caso de los *scaffolds*, por no poseer una estructura interna porosa. Tampoco se ha realizado el ensayo de densidad de los *films* ya que la densidad del PGS es ya conocida por un trabajo anterior (Rivero Gimeno, 2015).

5.1.1 RESULTADOS DEL ENSAYO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En el ensayo de microscopía realizado se han fotografiado las muestras mediante el microscopio electrónico de barrido mostrado en la Figura 16. Las fotografías se han efectuado con aumentos de 50x, 200x y 500x.

De los *scaffolds A* se han seleccionado muestras a las que se les ha realizado el corte en frío y con cuchilla. Todas estas han sido favorables y por ello se les ha realizado fotografías con aumentos de 50x, 200x y 500x para el corte en frío y para el corte con cuchilla.

En cambio, para los *scaffolds B* se ha realizado el ensayo considerándolo como desfavorable (con aumentos de 50x y 500x). Esto se debe a que las muestras obtenidas presentaban grandes regiones de PGS compactado. Para la muestra *scaffold 3D* debido a la estructura con grandes cavidades y luz de malla, las imágenes capturadas se han realizado con un aumento de 50x.

Por tanto, a continuación, se presentan las fotografías realizadas con 50x, 200x y 500x de la porción del *scaffold A* cortada con cuchilla. Estas se muestran en la Figura 46, Figura 47-A y Figura 47-B, respectivamente.

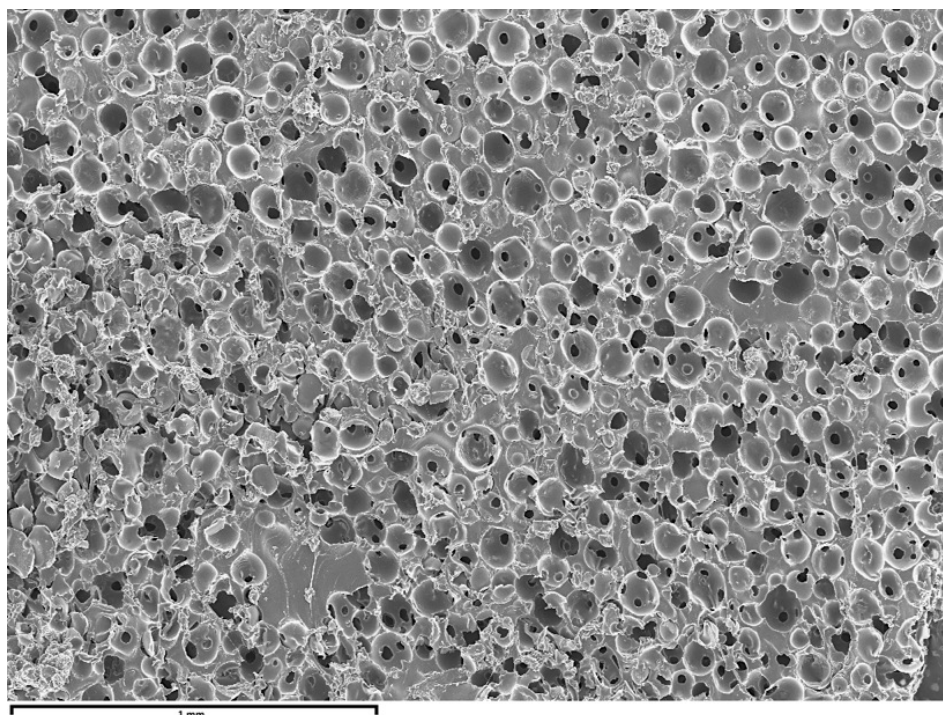


Figura 46. Fotografía del SEM con 50x del *scaffold* obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte con cuchilla.

En la Figura 46 se observa cómo se han generado una multitud de poros de dimensiones similares e interconectados entre ellos por pequeñas cavidades en sus paredes. Los poros han sido formados debido a que el prepolímero ha envuelto a las esferas de PMMA rellenando los huecos, durante el proceso de curado. Una vez iniciado el proceso, las esferas se encuentran en pleno contacto entre ellas y a medida que aumentan la temperatura consiguen contactar entre ellas sin llegar a perder la forma. Esto se debe a que, a la temperatura de curado, 130 °C, el PMMA se encuentra en estado gomoso y con una relativamente baja viscosidad, ya que se ha superado su temperatura de transición vítrea. Esto ocurre paralelamente con el curado del prepolímero que genera un encapsulamiento y hace que no pierda la forma. Esta estructura porosa es el resultado de extraer el PMMA en el lavado con la acetona, que se muestra en detalle en las imágenes con 200x, A, y 500x, B, de la Figura 47.

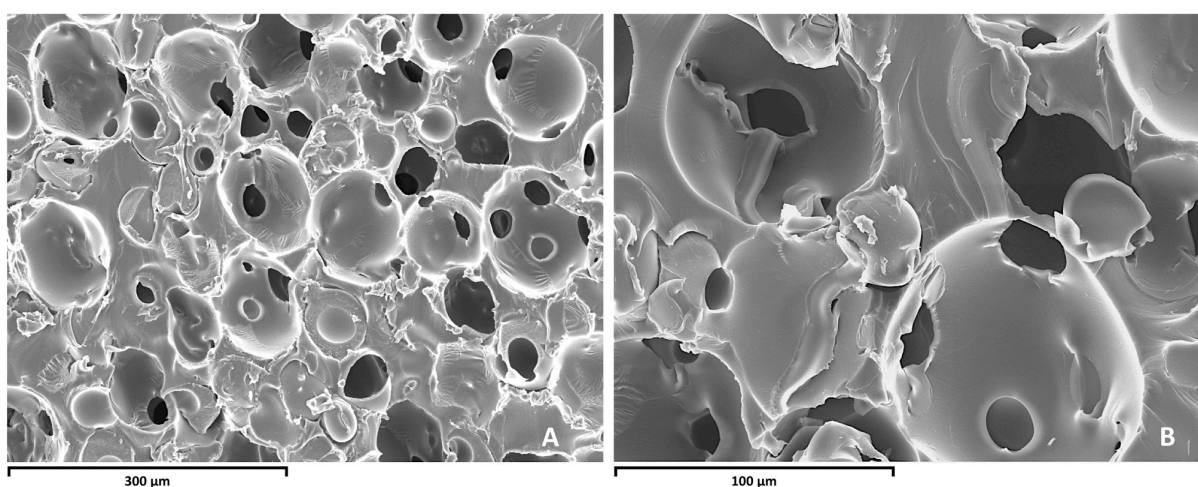


Figura 47. Fotografías del SEM con A) 200x y B) 500x al *scaffold* obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte con cuchilla.

En la imagen A de la Figura 47 con un aumento de 200x se puede observar la similitud que guardan entre sí los poros obtenidos y los pequeños orificios que los conectan, aunque existen regiones donde no se han generado estos por haber una pequeña acumulación de PGS. En la imagen B de la Figura 47 se aprecian incluso las cavidades de otros planos de visualización a través de las interconexiones, lo que sugiere una amplia interconectividad entre poros en todo el espesor del *scaffold*. Esto es de gran importancia para conseguir la colonización del *scaffold* por parte de células endoteliales y su posterior vascularización. Por el contrario, se observan irregularidades en la superficie de los poros con zonas aristadas debido al corte con cuchilla. Las imágenes mostradas a continuación, en las que se ha realizado el corte en frío, carecen de dichas irregularidades.

Las imágenes siguientes hacen referencia a la porción que ha sido cortada transversalmente con un corte en frío. De nuevo se presentan los aumentos 50x, 200x y 500x en las Figuras 48, Figura 49-A y Figura 49-B, respectivamente.

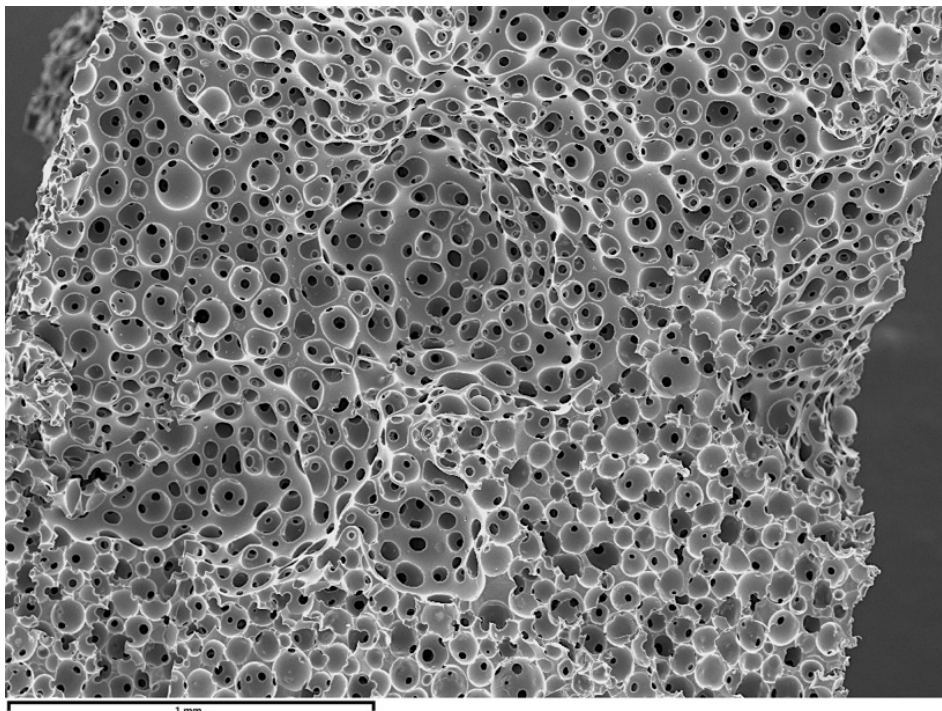


Figura 48. Fotografía del SEM con 50x al *scaffold* obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte en frío.

Como se puede ver en la Figura 48, gracias al corte en frío existe una llamativa diferencia respecto de la Figura 46 en la que el corte ha sido con cuchilla. El corte en frío ha provocado una sección frágil limpia, en el que no se han producido deformaciones de la superficie que distorsione su visión, y se distingue con mayor claridad la estructura porosa real interna del *scaffold*. Gracias a esto, se consigue corroborar de manera más efectiva que la muestra presenta una distribución homogénea de los poros y una regularidad de tamaños, además de una gran interconectividad entre ellos. En las imágenes de la Figura 49 se puede examinar con mayor facilidad la regularidad y la interconectividad, respectivamente.

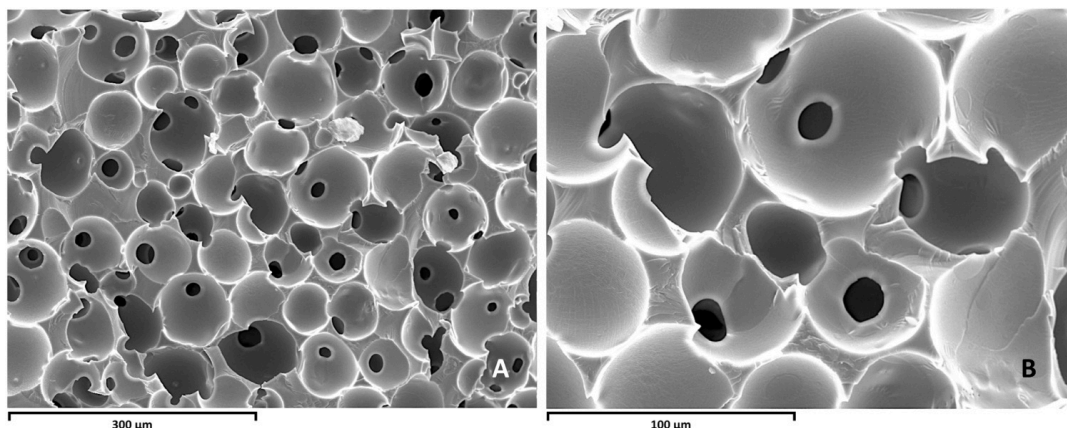


Figura 49. Fotografía del SEM con A) 200x y B) 500x al *scaffold* obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (50/50) y corte en frío. Barras de escala 300 µm (A) y 100 µm (B).

Observando la imagen A de la Figura 49 es posible apreciar la reproducibilidad de la distribución de tamaños de poro que se ha conseguido. A diferencia de la imagen A de la Figura 47, no existen aglomeraciones del biomaterial. Por tanto, estos colapsos no eran propios de la muestra, sino que han sido producidas por el corte realizado con la cuchilla.

En la imagen B de la Figura 49, además se observa que la dimensión de los poros es del orden de 100 µm, ideal para albergar células endoteliales de vasos sanguíneos ya que estas poseen unas dimensiones medias de 50 µm (Ortez, 2012). Estos tamaños son adecuados para el alojamiento porque permite que estén en contacto entre ellas a la vez que se evita que fluyan. Los poros poseen formas cóncavas redondeadas, y regulares lo que beneficia al metabolismo y la adhesión de las células. Conjuntamente se aprecian cavidades claramente diferenciadas más allá del plano de enfoque, lo que le confiere profundidad, y hasta siete conexiones entre poros. Se reafirma una aceptable interconectividad del *scaffold*, suficiente para plantearse, como primera aproximación, que las células puedan proliferar y migrar.

Seguidamente se exponen las imágenes del *scaffold B*. Cabe recordar que estas han sido obtenidas con esferas de PMMA con diámetro de 126-150 µm y en condiciones de porosidad estimada de 50 % y relación de THF (70/30). En primer lugar, se presentan las fotografías de la porción cortada con cuchilla y con aumentos de 50x y 500x conjuntamente en la Figura 50.

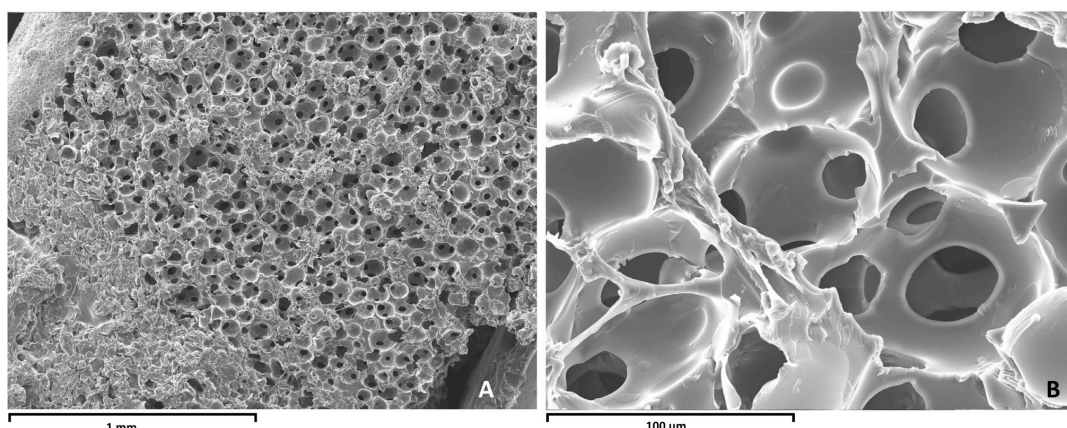


Figura 50. Fotografía del SEM con A) 50x y B) 500x del *scaffold* obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (70/30) y corte con cuchilla.

Nótese que en la esquina inferior izquierda de la imagen A de la Figura 50, se ha generado un aglomerado de PGS formando una masa maciza y sin poros, y en la parte superior derecha se han generado los poros con una morfología muy similar a la observada en el *scaffold A*. Esto se piensa que es a causa de la relación de PGS/THF, puesto que la función de este es disminuir la viscosidad del prepolímero y que fluya entre las esferas de PMMA. Por tanto, lo que ha sucedido es que el THF se ha evaporado antes de que el prepolímero consiguiera envolver a todas las esferas contenidas en el molde debido a una volatilidad relativamente alta del THF a la temperatura de curado y la baja cantidad de este en relación con el prepolímero.

En la imagen B de la Figura 50 la captura se ha focalizado en la región donde sí se han generado los poros y orificios para así poder realizar la comparación con la equivalente del *scaffold A*, Figura 47. Comparándolas, se puede observar que guardan cierta similitud, pero es cierto que el tamaño de los orificios parece ligeramente superior, y se divisan paredes del poro muy finas. Esto es debido a la baja fluencia del PGS entre las esferas y la aglomeración en la otra región.

Seguidamente se exponen las imágenes capturadas de la porción cortada en frío del *scaffold B*. Estas se pueden observar conjuntamente en la Figura 51.

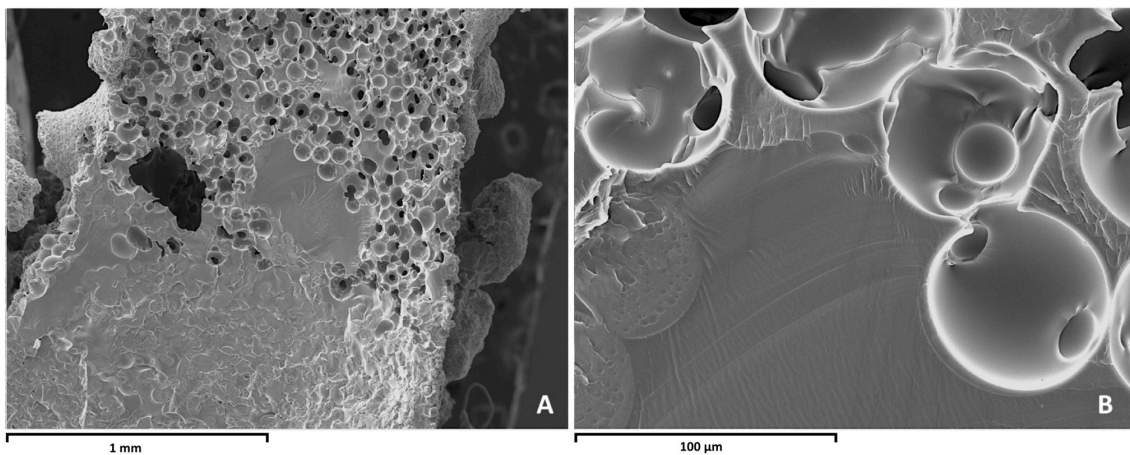


Figura 51. Fotografías del SEM con A) 500x y B) 50X del *scaffold* obtenido con PMMA en condiciones de 50 % de porosidad estimada, relación de THF (70/30) y corte en frío.

En la esquina inferior izquierda de la imagen A de la Figura 51, se puede ver de nuevo la aglomeración de PGS obtenida y la zona superior porosa con un corte limpio tras realizarse con nitrógeno líquido. En la imagen B de la Figura 51, es posible apreciar la brusca transición de la región compacta a la región porosa, lo que indica que efectivamente una importante cantidad de prepolímero no logró permear en el espacio entre las bolas de porógeno. Alternativamente, hubiera podido suceder que se fundiera por completo el porógeno y se hubieran separado en fases este y el PGS curado. Este caso no parece haberse dado ya que se hubiera observado una transición entre ambas regiones. A diferencia de la muestra cortada con cuchilla, esta última mostrada presenta una porosidad e interconectividad más pobre a causa del defectuoso reparto del polímero entre las esferas porogénicas. Por tanto, un efecto a considerar es la relación de THF empleada, dado que para las mismas porosidades estimadas se han obtenido resultados totalmente distintos.

En último lugar, se ha explorado la estructura del *scaffold 3D*. De este se han realizado dos capturas con aumento de 50x de dos regiones distintas mostradas conjuntamente en la Figura 52.

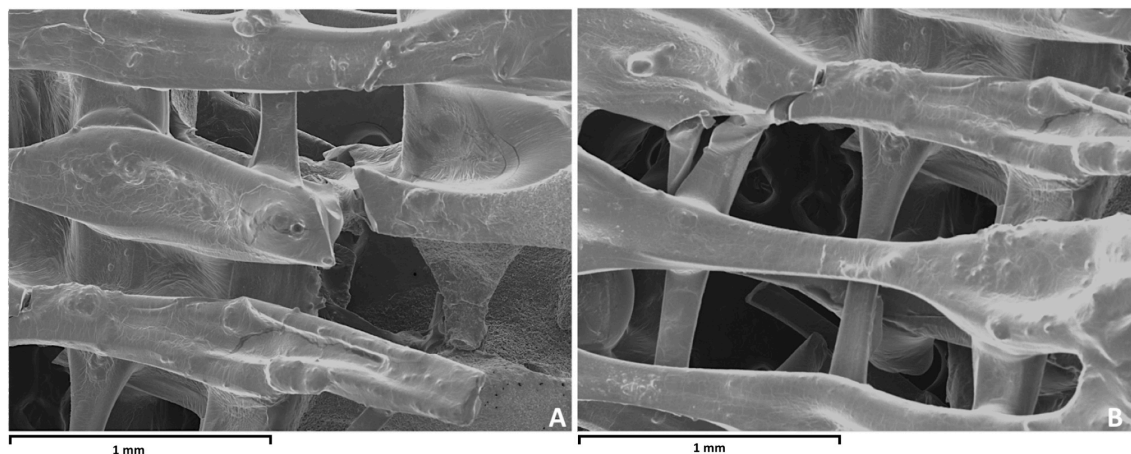


Figura 52. Fotografías del SEM de la A) región izquierda y B) región derecha del *scaffold* obtenido con plantilla porogénica, relación de THF (70/30) y corte con cuchilla.

Como se aprecia en ambas imágenes de la Figura 52, la muestra 3D ha tomado el negativo de la estructura de malla que presentaba la plantilla porogénica. De esta no fue posible obtener una imagen con fractura frágil en frío del *scaffold*, ya que se fragilizaba en exceso y se quebraban las hebras ortogonales. En comparación con los *scaffolds* obtenidos por la técnica de *particulate leaching*, se pone de manifiesto que existen diferencias estructurales entre ambas técnicas, ya que para esta el tamaño de poro obtenido es de un orden de entre 1 y 3 mm, sumamente superior a las 100 μm . Por lo tanto, las células endoteliales en su caso tendrían mucha más dificultad para encontrarse para formar una capa continua de células y dar lugar al tejido vascular. Además, el espesor de las trabéculas es de grandes dimensiones, hasta 300 μm , comparado con la pared de los poros de los anteriores *scaffolds*, que puede medir hasta 10 μm .

Por otro lado, que las hebras sean macizas hará que la biodegradación del polímero sea de tipo superficial, en lugar de la degradación *bulk*. La degradación *bulk*, o en bloque, se refiere a una degradación homogénea del material. Que la degradación sea homogénea es interesante para que el material no presente regiones con propiedades mecánicas diferentes (Vilariño Feltrer, 2016). La estructura del *scaffold 3D*, en cambio, tendrá una degradación por erosión superficial que dará lugar a un material con capas de diferentes propiedades. Asimismo, la estructura no es cóncava como en los casos anteriores y, además, es rugosa e irregular en algunos puntos. Estos aspectos estructurales darán lugar a comportamientos heterogéneos desde el punto de vista mecánico y biológico. La técnica de *porogen leaching* con plantillas fabricadas mediante la actual tecnología de impresión 3D todavía se ve limitada en los tamaños de poro que puede conseguir. En cambio, la técnica de *particulate leaching* no tiene esta limitación y se consiguen de forma más fácil y práctica.

5.1.2. ENSAYO DE DENSIDAD Y POROSIDAD

Tras haberse validado que la estructura de los *scaffolds* fabricados es porosa, es factible realizar el ensayo de densidad y porosidad. De lo contrario, el ensayo de porosidad carecería de sentido, pues se realizaría en un material no poroso. Del mismo modo que para el ensayo de microscopía electrónica de barrido, los *scaffolds* se han clasificado como:

- *scaffold A* con porosidad estimada de 50 % y relación THF (50/50),
- *scaffold B* con porosidad estimada de 50 % y relación THF (70/30) y
- *scaffold 3D*.

En la Tabla 13, se presentan los resultados obtenidos del ensayo de densidad, porosidad y los datos experimentales de la porosidad estimada para las experiencias de los *scaffolds A* y *B*. Los datos experimentales del ensayo se recogen en las Tablas de la 1.11 a la 1.17 del Anexo 1.

Tabla 13. Densidades experimentales y medias obtenidas del ensayo de densidad.

	Densidad media (g/cm ³)	Porosidad experimental media	Porosidad estimada media
Scaffold A	1,164 (±0,021)	69,90 % (±0,08)	62,10 % (±0,01)
Scaffold B	1,184 (±0,010)	63,62 % (±0,02)	61,84 % (±0,01)
Scaffold 3D	1,035 (±0,030)	65,69 % (±0,01)	n/a

En primer lugar se debe aclarar que para realizar los cálculos de porosidad estimada se ha hecho uso de la densidad del prepolímero, 0,7 g/cm³ (Gao et al., 2006). Este dato tan solo es utilizado para tener una relación másica de referencia puesto que es el prepolímero el que se está mezclando con el porógeno a utilizar. En cambio, para poder comparar los resultados obtenidos se ha tomado la densidad del PGS tras el proceso de curado, 1,138 g/cm³ (Rivero Gimeno, 2015). Cabe destacar que esta densidad de PGS curado ha sido obtenida a partir de *films* de PGS y no de *scaffolds*, por lo que también se puede conocer las discrepancias entre ambos.

Por tanto, esta densidad se compara con los datos mostrados en la Tabla 13 de las densidades medias obtenidas para los *scaffolds A*, 1,164 (g/cm³), y los *scaffolds B*, 1,184 (g/cm³), donde se puede considerar que ambas son muy similares. Esto se debe a que la densidad que se está midiendo es solo la de la matriz polimérica y no la del *scaffold* en conjunto. Es decir, como el n-octano estaba en el interior de los poros durante el pesaje, solo se ha evaluado la masa de PGS entrecruzado. La pequeña variación existente con respecto de la densidad teórica de los *films* puede deberse a que, en la fabricación de *films*, los reactivos se encuentran más dispersados en la mezcla y, por tanto, una pequeña parte del glicerol es capaz de evaporar a la temperatura de curado.

En cuanto a las diferencias de densidades de los *scaffolds* fabricados, se observa que los fabricados con PMMA han resultado con densidades similares, en cambio, para el *scaffold 3D* se ha obtenido una densidad ligeramente inferior. Esto se puede deber a un error experimental en el ensayo, debido a que el n-octano escapaba con facilidad de los poros al coger la muestra con las pinzas, o cabe la posibilidad de que en el proceso de curado parte del PVA se retuviera entre las cadenas poliméricas entrecruzadas del PGS. Estos datos son aproximaciones; en estudios venideros se testearán nuevas réplicas con las mismas condiciones de curado para confirmar o refutar estos hallazgos.

Por otro lado, la porosidad estimada de los *scaffolds* fabricados se ha calculado tomando la densidad de los *films* de PGS entrecruzado para así poder comparar los resultados estimados con los

experimentales. Por tanto, comparando los datos mostrados en la Tabla 13, se puede observar una diferencia entre la porosidad estimada y la experimental de 7 % para los *scaffolds A* y una diferencia cuasi despreciable para los *scaffolds B*. Ambas diferencias son poco significativas y es posible afirmar que el *scaffold* ha adoptado la porosidad definida previamente. Comparando con otro ensayo realizado mediante *particulate leaching*, con cloruro sódico como porógeno, en el que se han obtenido porosidades del orden de 80% (Gao *et al.*, 2006) e incluso del 91 % (Radisic *et al.*, 2006) se puede considerar que el nivel de porosidad conseguido, $\approx 70\%$, aun siendo inferior es bueno. Pero para conseguir una mejora o aumento de porosidad se debe tener en cuenta un buen mezclado del prepolímero con el porógeno para evitar las aglomeraciones de polímero cuando se utilizan cantidades mayores de porógeno. Esto se daba en las experiencias donde se utilizaba una relación de PGS/THF de (70/30) y una porosidad estimada de 70%, por lo que con una mayor cantidad de THF hubiese ayudado al mezclado y teóricamente una mayor porosidad.

Por último, las porosidades experimentales obtenidas para ambas técnicas de fabricación de *scaffolds* son aproximadamente las mismas, debido a que se ha hecho uso de una relación similar de prepolímero y porógeno y tan solo se han diferenciado en el modo de obtención de la estructura porosa.

5.1.3. ENSAYO MECÁNICO DE COMPRESIÓN PARA EL ANÁLISIS DE MODULO ELÁSTICO

Una vez visualizadas las estructuras, y conocidas las densidades y porosidades de los *scaffolds* fabricados, se ha realizado un último ensayo de caracterización para conocer el módulo de Young (E) de dichos *scaffolds* a bajas deformaciones. Para el ensayo se han tomado tres réplicas tanto de los *scaffolds* como de los films obtenidos por el protocolo estándar y optimizado. En la Figura 53 se muestran de forma comparativa el comportamiento medio que han presentado durante el ensayo las muestras fabricadas por el protocolo optimizado de prepolimerización.

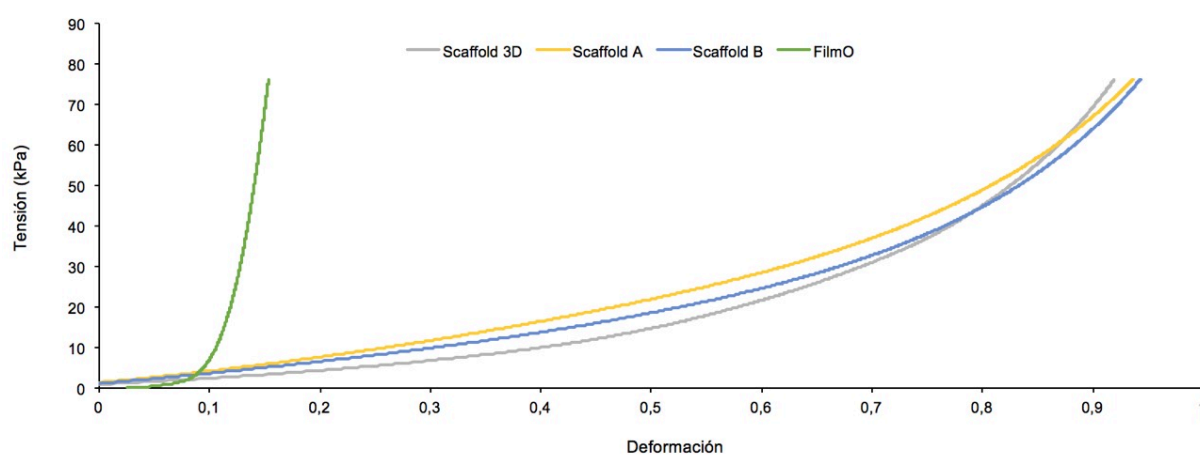


Figura 53. Gráfico tensión-deformación unitaria comparativo de las muestras (*film* y *scaffolds*) fabricadas mediante el protocolo optimizado.

Para obtener el módulo de Young de la región de bajas deformaciones, se ha realizado un ajuste lineal de los datos que pertenecen a la región pseudolineal inicial de deformaciones ($< 5\%$ para el film y $< 30\%$ para los *scaffolds*). Esto se debe a que el módulo de Young, o módulo elástico, es la pendiente de la recta tangente a la curva, y solo tiene sentido físico en los tramos que son aproximables a un

comportamiento lineal (o elástico). En la Figura 54 se puede observar este ajuste de forma comparativa de los tres *scaffolds*.

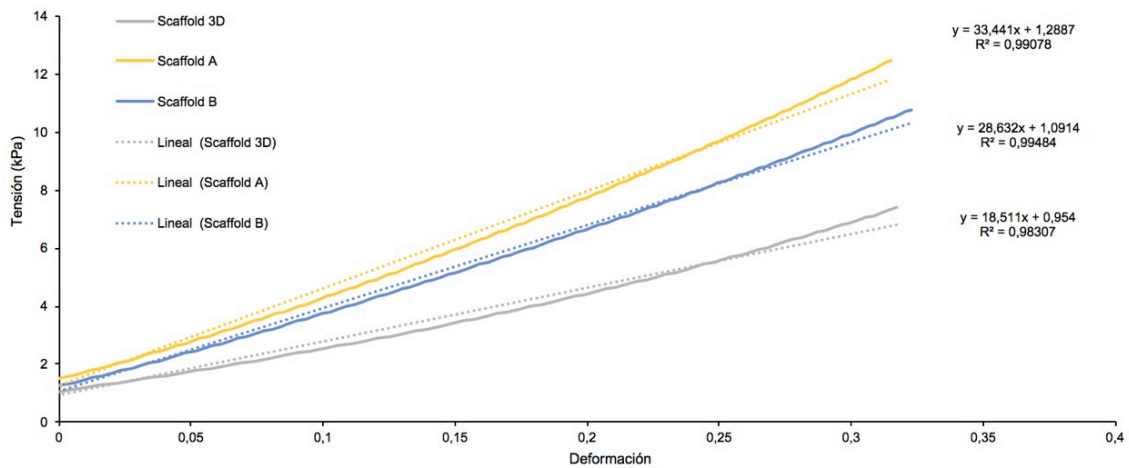


Figura 54. Gráfico comparativo del ajuste de los datos obtenidos para el cálculo del módulo de Young a bajas deformaciones de los *scaffolds*.

Como se observa en la Figura 54, para los *scaffolds* A y B, fabricados con PMMA como porógeno, se han obtenido un módulo elástico de 33,44 kPa y 28,63 kPa respectivamente. Estos módulos están en el rango de trabajo del miocardio del corazón humano que oscila entre 20-500 kPa (Loh *et al.*, 2015) pero todavía lejos del módulo elástico de 600 kPa que posee la elastina, proteína principal de arterias, venas y otros órganos, y de la aorta con $E=300$ kPa (Rodríguez Soler, 2003). Estos módulos elásticos son de la primera región pseudolineal que se observa en el gráfico representado en la Figura 53 porque es el rango de deformaciones a las que se verían sometidos los *scaffolds* en las condiciones fisiológicas para las que se diseña. En esta región el comportamiento es debido a la deformación experimentada únicamente por las paredes de la estructura porosa. En el punto que se observa la curvatura de la representación se debe al colapso de la estructura porosa y la segunda región pseudolineal de altas deformaciones se debe a la resistencia a compresión de las propias cadenas compactas de polímero y no de la estructura porosa.

En la Figura 55 se muestra de forma comparativa en el comportamiento que han presentado durante el ensayo los *films* fabricados tanto por el protocolo estándar como optimizado.

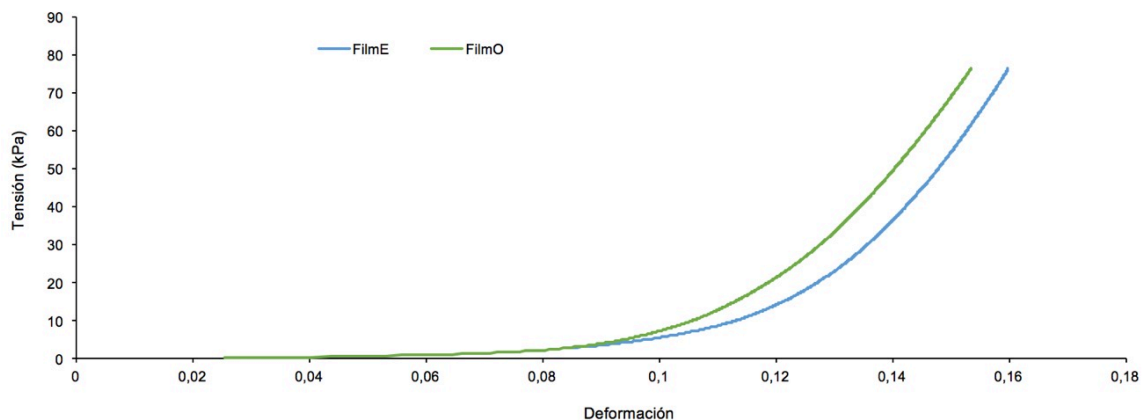


Figura 55. Gráfico tensión-deformación unitaria comparativo de los *films* fabricados por el protocolo estándar y optimizado.

Al igual que para las muestras anteriores, los datos han sido tratados para obtener el módulo elástico como se muestra en la Figura 57 para las muestras *FilmO* y *FilmE*.

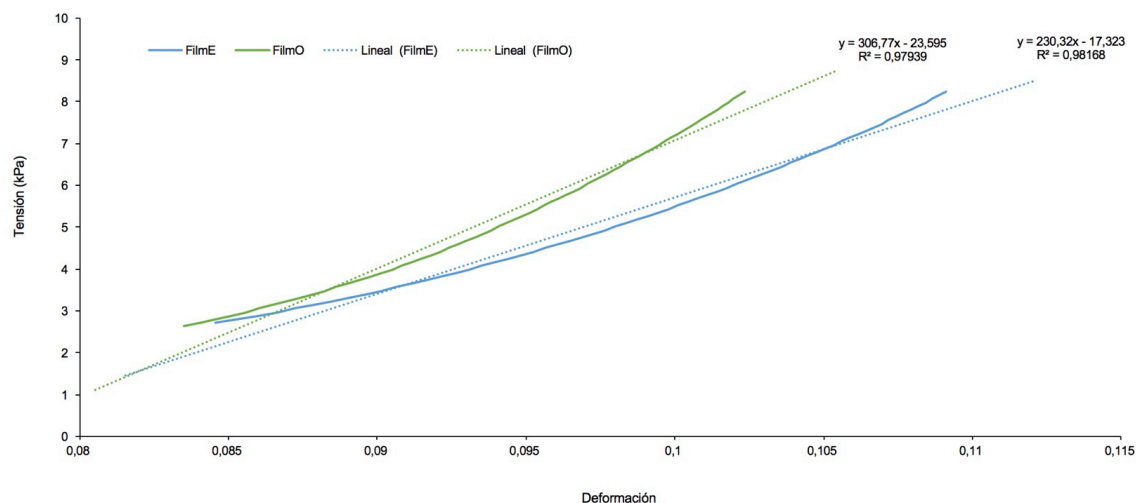


Figura 56. Gráfico con ajuste de los datos obtenidos para el cálculo del módulo de Young a bajas deformaciones de los *filmsO* y *filmsE*.

De los *films* fabricados por el protocolo optimizado se obtienen un valor de $E = 306,77$ kPa, y para los del protocolo estándar $E = 230,32$ kPa. La diferencia que presentan no es significativa, por lo que es probable de que se haya conseguido el mismo producto y que la reacción haya dado lugar al mismo polímero (en el sentido de red con el mismo grado de entrecruzamiento), al menos desde el punto de vista mecánico. Por tanto, con estos resultados, se deja una puerta abierta a futuras pruebas y ensayos para conocer las propiedades del prepolímero obtenido con el protocolo optimizado. Cabe destacar que los módulos elásticos obtenidos son de la primera región pseudolineal del gráfico representado en la Figura 56 porque, como ya se ha explicado, es el rango de las condiciones fisiológicas en las que se va a trabajar el material. La segunda región pseudolineal se representa en el gráfico de la Figura 58 en la que se ajusta la curva para obtener los valores a altas deformaciones.

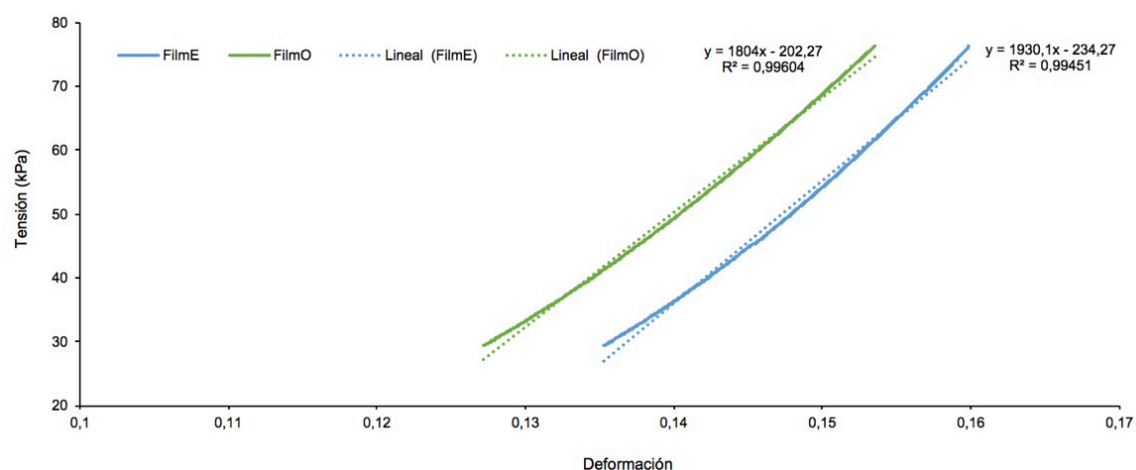


Figura 57. Gráfico con ajuste de los datos obtenidos para el cálculo del módulo de Young a altas deformaciones de los *filmsO* y *filmsE*.

Los resultados obtenidos son de $E = 1804$ kPa y $E = 1930$ kPa para los *filmsO* y *filmsE* respectivamente. De nuevo, las diferencias son poco significativas entre ambos. En cambio, comparando con los resultados obtenidos anteriormente en los ensayos de compresión de PGS a altas deformaciones realizados en el CBIT, se obtuvo un valor de 4600 kPa para las mismas condiciones en ambas fases de fabricación y valores de 2100 kPa y 3700 kPa en las que se variaron la temperatura de curado en 120 °C y 140 °C respectivamente (Rivero Gimeno, 2015) Por lo que, el PGS fabricado. Estas diferencias pueden ser debidas a diferencias sutiles observadas en las condiciones de los ensayos realizados.

En último lugar, se puede considerar que los *scaffolds* fabricados por *particulate leaching* han resultado con un módulo elástico aceptable comparándolo con los módulos que se requieren en las aplicaciones vasculares comentadas, pero estos todavía son lejanos para los módulos que se precisan para grandes vasos como la Aorta, con un módulo de 300 a 800 kPa. En un hipotético caso de que en un desarrollo futuro del proceso no se consiguieran las propiedades mecánicas requeridas, la alternativa posible sería utilizar el PGS como matriz extracelular emulada para que alojase las células, y a este a su vez adherirle una capa de otro material semipermeable que proporcionase el soporte mecánico.

6. CONCLUSIONES

En el Trabajo Fin de Grado realizado se ha logrado desarrollar un procedimiento para la fabricación de *scaffolds* a base de poliglicerol sebacato como biomaterial y diferentes tipos de porógenos para aplicar las técnicas de separación de fases o *porogen leaching* (empleando partículas o plantillas obtenidas por impresión 3D).

En primer lugar, el propósito de optimizar el protocolo de prepolimerización del PGS para conseguir un aumento en la producción de prepolímero ha resultado satisfactorio consiguiendo, como mínimo, cuadruplicar la cantidad de este, para poder ajustarla a las necesidades del estudio. Además, se puede concluir que desde el punto de vista de las propiedades mecánicas que han presentado los *films* optimizados fabricados, en comparación con los fabricados por el procedimiento estándar, el biomaterial obtenido es razonablemente similar.

En segundo lugar, en cuanto a la incorporación de diferentes sustancias para que actúen de porógeno para la fabricación de *scaffolds* porosos a partir de PGS: modificado

- la incorporación de cuatro tipos diferentes de porógenos para aplicar la técnica de separación de fases. De estos experimentos se desprenden resultados desfavorables para la aplicación propuesta en todos los casos. Con porógeno Tipo 1 (sustancias puras), ha resultado desfavorable por una separación prematura de las fases con la DMF al igual que el naftaleno que a su vez ha coloreado. Con Tipo 2 (mezcla de sustancias), se ha evaporado el n-octano de la mezcla con naftaleno. Con Tipo 3 (hidrocarburo), el PGS no ha curado debido a que la parafina ha generado un impedimento estérico en todas sus variantes. Y en último lugar, el PGS no ha conseguido curar en presencia de porógenos Tipo 4 (polímeros) como la PCL, o Pluronic P123 y F127.
- En cambio, la incorporación de porógenos Tipo 4 para aplicar la técnica de *particulate leaching* ha resultado desfavorable haciendo uso de microesferas de PEMA, donde no se ha conseguido el curado del PGS, pero sí se ha conseguido un resultado satisfactorio en el desarrollo de fabricación utilizando esferas de PMMA con un tamaño de 126-150 μm de diámetro y la plantilla porogénica de PVA.
- Con los resultados obtenidos utilizando PMMA, se ha conseguido el objetivo de fabricar *scaffolds* con las características estructurales determinadas. De estos se han realizado los ensayos de microscopía (SEM), densidad y de comportamiento mecánico. En el SEM la estructura porosa observada ha resultado satisfactoria, mostrando regularidad en la superficie de las paredes de los poros, una porosidad del 70 %, con un tamaño de poro del orden de 100 μm y con buena interconectividad entre ellos, propiedades beneficiosas para el alojamiento y colonización celular. Se ha obtenido una densidad del PGS de los *scaffolds* semejante a la conseguida en *films* de ensayos anteriores. Por último, se han obtenido módulos de Young ligeramente inferiores a los que presentan los principales vasos sanguíneos, pero que se encuentran dentro del rango en el que trabaja el músculo miocárdico.
- Los *scaffolds* fabricados con plantillas porogénicas de PVA tipo rejilla han resultado satisfactorios por adoptar la estructura de la plantilla porogénica en la que vertió el prepolímero, pero a diferencia de los fabricados mediante esferas de PMMA, estos han

presentado una estructura porosa menos favorable para la población celular, con tamaños de poros demasiado grandes y hebras macizas que pueden empeorar la biodegradación.

En definitiva, se puede concluir que se ha conseguido fabricar *scaffolds* con las propiedades marcadas en los objetivos mediante la técnica de particulate leaching con esferas de PMMA como porógeno y con condiciones de 50 % de porosidad estimada y relación de PGS/THF de (70/30). Dichos *scaffolds* obtenidos tienen una porosidad de 70 %, una densidad de $1,164 \text{ g/cm}^3$, un módulo de 33,44 kPa y unas propiedades morfológicas de 100 μm de tamaño de poro, 10 μm de tamaño de trabécula, paredes de poro regulares e interconectividad, todas ellas son adecuadas para su uso propuesto como biomaterial en ingeniería tisular vascular.

La diferencias entre los *scaffolds* fabricados con plantilla porogénica a los fabricados con esferas de PMMA son significativas. Los *scaffolds* con plantilla de PVA han expuesto propiedades, por ejemplo de hasta 3 mm de tamaño de poro y hebras macizas, que no se adecuan a las propuestas para su aplicación como biomaterial.

En este trabajo se ha consolidado conocimientos académicos adquiridos en las asignaturas de la titulación de Grado en Ingeniería Química y ampliado, y de forma conjunta se ha logrado adquirir las competencias necesarias para trabajar en un laboratorio tanto de forma individual como en grupo y mejorar el trabajo en equipo con los tutores y/o compañeros.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Adicionalmente, en futuros desarrollos de la fabricación de *scaffolds* de PGS mediante la técnica de separación de fases de la que no se han conseguido resultados satisfactorios con los porógenos de sustancias puras, hidrocarburos, o de aquellas sustancias que precisan de un aumento ebulloscópico, sería de interés realizar pruebas con una disminución drástica de la porosidad estimada de los testados o retomar una nueva búsqueda de sustancias que cumplan con los requisitos marcados, incluyendo quizá moléculas específicamente sintetizadas para tales fines. Al usar polímeros, como la PCL, como porógenos, sería interesante disminuir la proporción másica y aumentar el porcentaje de acetona utilizada para su disolución, como alternativa posible para evitar que la viscosidad de esta impida el curado del prepolímero.

La técnica de *particulate leaching* con PEMA no se considera de utilidad debido a que a la temperatura que se realiza el proceso de curado este disminuye su viscosidad considerablemente. En cambio es posible una optimización de la fabricación de *scaffolds* mediante esferas de PMMA con un aumento de la porosidad estimada, por ejemplo al 70 %, pero conjuntamente aumentar la cantidad de THF adicionado al prepolímero para que este consiga fluir entre las esferas de PMMA.

En paralelo, sería de interés un estudio reométrico y/o de química analítica durante la reacción química para complementar el ensayo mecánico efectuado a los *films* y corroborar paralelamente que el prepolímero fabricado mediante el proceso optimizado adquiere las mismas características que por el proceso estándar.

Para finalizar, todas estas propiedades estructurales y mecánicas de los *scaffolds* obtenidos se consolidarán como satisfactorias en futuras siembras de células endoteliales, si estas consiguen proliferar, colonizar y formar capas de células para formar el nuevo tejido vascular. En la actualidad, colaboradores del centro de investigación donde se han realizado los experimentos del presente trabajo, están llevando a cabo ensayos de supervivencia y viabilidad celular sobre fibroblastos de ratón (de la línea celular L929) cultivados durante periodos cortos de tiempo en el interior de los *scaffolds* producidos en el marco de este Trabajo Final de Grado.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1- Albornoz, J. C. Prótesis de cadera. Obtenido el 16 de Junio de 2016, de <http://www.tutraumatologo.com>.
- 2- Bettinger, C. J.; Orrick, B.; Misra, A.; Langer, R.; Borenstein, J. T. Microfabrication of Poly (Glycerol-Sebacate) for Contact Guidance Applications. *Biomaterials* **2006**, *27* (12), 2558–2565.
- 3- Boonthekul, T.; Mooney, D. J. Protein-Based Signaling Systems in Tissue Engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14* (5), 559–565.
- 4- Bose, S.; Bandyopadhyay, A. *Introduction to Biomaterials*; Elsevier, 2013.
- 5- Bostrom, L.; Weinhold, R.; Design, C.; Scaffold, S. *Tissue Engineering Scaffolds*, Third Edit.; Elsevier, 1998.
- 6- Cecilia Fabres V. Técnicas Del Futuro: Ingeniería de Tejidos Y Uso de Celulas Madre Eb Medicina Reproductiva. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **2010**, *21* (3), 488–493.
- 7- Chen, G.; Ushida, T.; Tateishi, T. Development of Biodegradable Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2001**, *17* (1-2), 63–69.
- 8- Crapo, P. M.; Gao, J.; Wang, Y. Seamless Tubular Poly(glycerol Sebacate) Scaffolds: High-Yield Fabrication and Potential Applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *86* (2), 354–363.
- 9- Dalton, P. D.; Woodfi, T. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bone* **2008**, *32* (3), 2004–2005.
- 10- Falke, G.; Anthony, A. Reconstrucción de Tejidos Y Órganos Utilizando Ingeniería Tisular. *Arch argent pediatr* **2000**, *98* (2), 103–115.
- 11- Gao, J.; Crapo, P. M.; Wang, Y. Macroporous Elastomeric Scaffolds with Extensive Micropores for Soft Tissue Engineering. *Tissue Eng.* **2006**, *12* (4), 917–925.
- 12- González-Jiménez, A. A.; Malmierca, M. A.; Bernal, P. P.; Marcos-fernández, Á.; Díaz, A. R.; Valentín, J. L. Biomateriales Elastoméricos En Ingeniería Tisular. **2014**, *107*, 21–24.
- 13- Griffith, L. G. Emerging Design Principles in Biomaterials and Scaffolds for Tissue Engineering. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *961*, 83–95.
- 14- Huang, Z. M.; Zhang, Y. Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **2003**, *63* (15), 2223–2253.
- 15- Knut, M. Edicionese. Obtenido el 15 de Junio de 2016, de <http://www.edicionese.com>.
- 16- Kohane, D. S.; Langer, R. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. *Pediatr. Res.* **2008**, *63* (5), 487–491.
- 17- Lam, C. X. F.; Mo, X. M.; Teoh, S. H.; Hutmacher, D. W. Scaffold Development Using 3D Printing with a Starch-Based Polymer. *Mater. Sci. Eng. C* **2002**, *20* (1-2), 49–56.

- 18- Langer, R. V. J. P. Tissue Engineering. *Science* (80-.). **1993**, 260 (5110), 920–926.
- 19- Liu, C.; Xia, Z.; Czernuszka, J. T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chem. Eng. Res. Des.* **2007**, 85 (7), 1051–1064.
- 20- Lizarbe, M. A. Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales a La Ingeniería Tisular. *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* **2007**, 101 (1), 227–249.
- 21- Loh, X. J.; Abdul Karim, A.; Owh, C. Poly(glycerol Sebacate) Biomaterial: Synthesis and Biomedical Applications. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3 (39), 7641–7652.
- 22- Maliger, R.; Halley, P. J.; Cooper-White, J. J. Poly(glycerol-Sebacate) Bioelastomers-Kinetics of Step-Growth Reactions Using Fourier Transform (FT)-Raman Spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 127 (5), 3980–3986.
- 23- Mauck, R. Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Nat. Biotechnol.* **2011**, 1–576.
- 24- Murphy, C. M.; O'Brien, F. J.; Little, D. G.; Schindeler, A. Cell Scaffold Interactions in the Bone Tissue Engineering Triad. *Eur. Cell. Mater.* **2013**, 120–132.
- 25- Nerem, R. M.; Seliktar, D. Ascular Issue Ngeineering. *Engineering* **2001**, 3, 225–243.
- 26- OMS, Enfermedades cardiovasculares. Obtenido el 27 de Junio de 2016, de <http://www.who.int>.
- 27- OMS, Las 10 causas principales de defunción en el mundo. Obtenido el 5 de Julio de 2016, de <http://www.who.int>.
- 28- Orive, G.; Hernandez, R. M.; Garcón, A. R.; Gartua, M.; Pedríguez, M. J. L.; Hernández, R. M.; Garcón, A. R.; Igartúa, M.; Pedríguez, J. L. Tissue Engineering: Progress and Challenges. *Vitae, Rev. LA Fac. Quim. Farm.* **2003**, 10 (2), 46–51.
- 29- Ortez, L. fisiología del endotelio. Obtenido el 4 de Julio de 2016, de http://es.slideshare.net/Luis_Ortez/
- 30- Park, J.; Lakes, R. S. *Biomaterials: An Introduction: Third Edition*; 2007.
- 31- Peter X, M. Scaffolds for Tissue Fabrication. *Mater. Today* **2004**, 7 (5), 30–40.
- 32- Petrucci, R. H.; Herring, F. G.; Madura, J. D.; Bissonnette, C. *Química General: Principios Y Aplicaciones Modernas*; 2011.
- 33- Poling, B. E.; Prausnitz, J. M.; O'Connell, J. P. Chapter One the Estimation of Physical. *Library (Lond)*. **2006**, 23 (3), 1–11.
- 34- Radisic, M.; Park, H.; Chen, F.; Salazar-Lazzaro, J. E.; Wang, Y.; Dennis, R.; Langer, R.; Freed, L. E.; Vunjak-Novakovic, G. Biomimetic Approach to Cardiac Tissue Engineering: Oxygen Carriers and Channeled Scaffolds. *Tissue Eng.* **2006**, 12 (8), 2077–2091.
- 35- Rai, R.; Tallawi, M.; Grigore, A.; Boccaccini, A. R. Synthesis, Properties and Biomedical Applications of Poly(glycerol Sebacate) (PGS): A Review. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37 (8), 1051–1078.

-
- 36- Raisman, J.; Gonzalez, A. M. Célula Eucariota I. Generalidades. Obtenido el 26 de Junio de 2016, de <http://www.biologia.edu.ar>.
- 37- Ratner, B.; Bryant, S. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004, pp 6:41–75.
- 38- Rivero Gimeno, H. Desarrollo de biomateriales basados en poliglicerol sebacato de biodegradabilidad y propiedades mecánicas controladas. **2015**.
- 39- Rodríguez Soler, J. Modelos Numéricos Para Mecánica Cardiovascular de Las Paredes Arteriales Y Sus Procesos de Adaptación. **2003**, 300.
- 40- Sant, S.; Iyer, D.; Gaharwar, A. K.; Patel, A.; Khademhosseini, A. Effect of Biodegradation and de Novo Matrix Synthesis on the Mechanical Properties of Valvular Interstitial Cell-Seeded Polyglycerol Sebacate-Polycaprolactone Scaffolds. *Acta Biomater.* **2013**, 9 (4), 5963–5973.
- 41- Schutte, S. C.; Nerem, R. M. *Chapter II.6.9 - Blood Vessel Tissue Engineering*, Third Edit.; Elsevier, 2013.
- 42- Sigma-Aldrich. Pluronic F127. Obtenido el 3 de Junio de 2016, de <http://www.sigmaaldrich.com>
- 43- Sigma-Aldrich. Pluronic P123. Obtenido el 3 de Junio de 2016, de <http://www.sigmaaldrich.com>
- 44- Sundback, C. A.; Shyu, J. Y.; Wang, Y.; Faquin, W. C.; Langer, R. S.; Vacanti, J. P.; Hadlock, T. A. Biocompatibility Analysis of Poly(glycerol Sebacate) as a Nerve Guide Material. *Biomaterials* **2005**, 26 (27), 5454–5464.
- 45- Unidad de Medio Ambiente. Obtenido el 25 de Junio de 2016, de <http://medioambiente.blogs.upv.es>.
- 46- Unidad de Medio Ambiente, U. Política ambiental. Obtenido el 25 de Junio de 2016, de <http://www.upv.es/entidades/AMAPUOC/>.
- 47- Vilariño Feltrer, G. BIOPOLÍMEROS Tema 4. Biodegradación, UPV. 2016.

PRESUPUESTO

1. JUSTIFICACIÓN DEL PRESUPUESTO

El estudio económico del presente Trabajo de Fin de Grado se desglosa en los gastos que supone realizar el diseño, seguimiento y corrección por parte del proyectista y los tutores, y en el coste económico atribuido a la ejecución de las diferentes actividades realizadas en los laboratorios del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la UPV. Este estudio se realiza a partir del cálculo del presupuesto de ejecución material para obtener el posterior presupuesto total del proyecto.

El presupuesto de ejecución material se constituye en tres aspectos: los costes del material utilizado, la maquinaria y la mano de obra que se necesitan para llevar a cabo los distintos procesos del trabajo en el laboratorio. En todos ellos se incluye un gasto en concepto de costes auxiliares.

Para ello, de forma detallada se presentan a continuación los cuadros presupuestarios que están compuestos por los conceptos siguientes:

- A. Cuadro de precios por clase, en el que se recogen y clasifican los recursos con sus precios según sean mano de obra, materiales, maquinaria o costes auxiliares.
- B. Cuadro de mediciones y presupuesto, en el que se detallan los precios descompuestos para cada unidad de obra considerada, así como los capítulos que corresponden a cada actividad con los recursos empleados en cada una y su precio, y en último lugar el presupuesto de ejecución material.
- C. Cuadro de presupuesto resumido, en el que se resumen los costes obtenidos en el cuadro de mediciones y presupuesto asociados a cada actividad, el coste del capítulo obtenido de la suma de las actividades que lo componen y la suma de cada capítulo para obtener el presupuesto de ejecución material.
- D. Cuadro de resumen de capítulos, en el que finalmente se recogen los costes de cada capítulo, el presupuesto de ejecución material, el presupuesto por contrata considerando los gastos generales y el beneficio industrial, y el presupuesto total considerando el IVA.

Para conocer los salarios de cada miembro se ha tomado como fuente la página web del Centro de Apoyo a la innovación, la Investigación y la Transferencia de Tecnología de la *Universitat Politècnica de València* (CTT-UPV, 2016). Para la maquinaria se han tomado los precios que se fijan en las páginas web de cada fabricante. Los precios de cada sustancia utilizada se toman de las web de cada casa comercial, y los materiales utilizados son precios genéricos obtenidos de distintas casas comerciales de suministradoras de material para laboratorio. Además, los coeficientes aplicados en el presupuesto total son del 13 % para los gastos generales, un 6 % de beneficio industrial y un 21 % de IVA.

A	Trabajo Fin de Grado	Página: 1
	CUADRO DE PRECIOS DE RECURSOS POR CLASE	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Código	Descripción del recurso	Precio
1	Mano de Obra	
MO.DIR	Director del proyecto	26,00
MO.DOC	Docente de investigación	17,00
MO.ING	Ingeniero químico	23,00
2	Maquinaria	
MAQ.BAL	Balanza Mettler Toledo AE-240	1.195,00
MAQ.BOM	Bomba de vacío Vacubrand	260,00
MAQ.BZM	Balanza Mettler Toledo AE-240	2.535,00
MAQ.DES	Desecador a vacío JP Selecta	1.440,00
MAQ.FTIR	Equipo de microscopia electrónica de barrido SEM	13,00
MAQ.HOR	Horno de ventilación forzada JP Selecta	1.000,00
MAQ.MAN	Manta calefactora Heidolp MR Hei-Standard	497,00
MAQ.REF	Equipo de reflujo con circuito de condensación	1.150,00
MAQ.TMA	Analizador termomecánico Seiko TMA SS6000	12,00
MAT.CRO	Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A	12,00
3	Material	
MAT.ABR	Abrazaderas 14/23	4,90
MAT.ABR2	Abrazaderas 29/32	6,50
MAT.ACE	Acetona Sigma Aldrich 99.5% pureza 2,5l	78,70
MAT.ACEI	Aceite térmico Sigma Aldrich Z60391	43,40
MAT.AFO	Matraz aforado 50 ml	4,30
MAT.AGUA	Agua desionizada 25l	15,90
MAT.AS	Ácido sebácico Sigma Aldrich 99%	55,60
MAT.BASE	SopORTE de corcho para matraz	5,90
MAT.BAT	Bata de laboratorio	14,90
MAT.CLL	Cuchilla	0,30
MAT.COD	Codo de vidrio 14/23	6,86
MAT.COD2	Codo de vidrio 29/32	10,77
MAT.DMF	Dimetilformamida Sigma Aldrich <99% 100 ml	60,30
MAT.EMB	Embudo de vidrio rama larga	8,50
MAT.EOH	Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza	10,20
MAT.ESPM	Espátula de metal	3,50
MAT.ESPP	Espátula de plástico	2,00
MAT.F127	Pluronic F127 Sigma Aldrich	66,20
MAT.GAI	Gafa integral	5,77
MAT.GLI	Glicerol VWR International 98% pureza	71,80
MAT.GUA	Guantes térmicos	25,00
MAT.GULA	Caja de guantes de látex	12,60
MAT.GUNI	Caja de guantes de nitrilo	12,60
MAT.IMA	Imán teflonado 20mm	4,10
MAT.IMA2	Imán teflonado 30mm	4,70
MAT.MALL	Malla nylon microperforada en rollo	53,00
MAT.MAT	Matraz esférico 250 ml 3 vías	24,60
MAT.MGA	Máscara de gases	29,50

A	Trabajo Fin de Grado	Página: 2
	CUADRO DE PRECIOS DE RECURSOS POR CLASE	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Código	Descripción del recurso	Precio
MAT.MOR	Mortero con mano	47,00
MAT.NAF	Naftaleno Scharlab 500g	39,00
MAT.NIT	Bala de nitrógeno	53,39
MAT.NUE	Nuez de laboratorio	3,99
MAT.OCT	Octano Sigma Aldrich 98% pureza	202,00
MAT.P123	Pluronic P123 Sigma Aldrich	58,54
MAT.PAD	Papel adhesivo	2,50
MAT.PAP	Papel aluminio	2,25
MAT.PARA	Parafilm	46,46
MAT.PARF	Parafina aceite Sigma Aldrich	39,10
MAT.PCL	Policaprolactona Polyscience 25g MW50000	184,00
MAT.PEMA	Polietil metacrilato 250g	47,80
MAT.PEO	Óxido de polietileno Polyscience 250g	132,50
MAT.PET	Placa Petri vidrio	11,10
MAT.PIN	Pinzas de metal	3,30
MAT.PINU	Pinzas para soporte universal	6,22
MAT.PINZ	Pinzas molde 20u	11,20
MAT.PIP	Pipeta Pasteur vidrio + tetina	0,23
MAT.PLA	Placa de vidrio molde	1,50
MAT.PMMA	Polimetil metacrilato Polyscience 250g	57,50
MAT.PTR	Placa Petri de plástico	0,25
MAT.PVA	Molde de alcohol polivinílico	19,00
MAT.REL	Vidrio reloj 80 mm	1,43
MAT.SEPT	Tapón septum 14/23	0,84
MAT.SEPT2	Tapón septum 29/32	3,51
MAT.SOP	Soporte universal	14,40
MAT.TEF	Lámina de teflón para molde 3mm	7,50
MAT.THF	Tetrahidrofurano Sigma Aldrich	125,00
MAT.TRAM	Trampa de nitrógeno	64,80
MAT.TRO	Troquel 5mm diámetro	3,50
MAT.VARI	Varilla de vidrio 300mm	3,30
MAT.VAS	Vaselina para juntas	5,50
MAT.VASO	Vaso de precipitados 100 ml	2,47
MAT.VASO2	Vaso de precipitados 1000 ml	7,16
MAT.VIAL	Vial 2 cm diámetro 50 caja	25,00
MAT.VPR	Vaso de precipitados vidrio 50 ml	3,10
MAT.ZIP	Bolsas Zip caja 1000u	41,70

4 Medio auxiliar

CO.AUX Costes auxiliares 2%

B	Trabajo Fin de Grado	Página: 1
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Medición	Precio	Importe
----------	-------------------------------------	----------	--------	---------

01 Síntesis de PGS

01.01 Fase de prepolimerización optimizada

01.01

MAQ.MAN	Manta calefactora Heidolp MR Hei-Standard	0,02	497,00	9,94
MAQ.BAL	Balanza Mettler Toledo AE-240	0,01	1.195,00	11,95
MAT.ESPM	Espátula de metal	1,00	3,50	3,50
MAT.ESPP	Espátula de plástico	1,00	2,00	2,00
MAT.VARI	Varilla de vidrio 300mm	1,00	3,30	3,30
MAT.IMA	Imán teflonado 20mm	1,00	4,10	4,10
MAT.IMA2	Imán teflonado 30mm	1,00	4,70	4,70
MAT.SOP	Soporte universal	3,00	14,40	43,20
MAT.BASE	Soporte de corcho para matraz	1,00	5,90	5,90
MAT.MAT	Matraz esférico 250 ml 3 vías	1,00	24,60	24,60
MAT.AFO	Matraz aforado 50 ml	1,00	4,30	4,30
MAT.EMB	Embudo de vidrio rama larga	1,00	8,50	8,50
MAT.PINU	Pinzas para soporte universal	5,00	6,22	31,10
MAT.PIN	Pinzas de metal	1,00	3,30	3,30
MAT.PIP	Pipeta Pasteur vidrio + tetina	3,00	0,23	0,69
MAT.COD	Codo de vidrio 14/23	1,00	6,86	6,86
MAT.COD2	Codo de vidrio 29/32	1,00	10,77	10,77
MAT.TRAM	Trampa de nitrógeno	1,00	64,80	64,80
MAT.SEPT	Tapón septum 14/23	5,00	0,84	4,20
MAT.SEPT2	Tapón septum 29/32	3,00	3,51	10,53
MAT.ABR	Abrazaderas 14/23	1,00	4,90	4,90
MAT.ABR2	Abrazaderas 29/32	1,00	6,50	6,50
MAT.VAS	Vaselina para juntas	1,00	5,50	5,50
MAT.PARA	Parafilm	0,50	46,46	23,23
MAT.VASO	Vaso de precipitados 100 ml	1,00	2,47	2,47
MAT.VASO2	Vaso de precipitados 1000 ml	1,00	7,16	7,16
MAT.REL	Vidrio reloj 80 mm	3,00	1,43	4,29
MAT.GUA	Guantes térmicos	0,02	25,00	0,50
MAT.NIT	Bala de nitrógeno	1,00	53,39	53,39
MAT.NUE	Nuez de laboratorio	5,00	3,99	19,95
MAT.GLI	Glicerol VWR International 98% pureza	0,25	71,80	17,95
MAT.AS	Ácido sebácico Sigma Aldrich 99%	1,00	55,60	55,60
MAT.ACEI	Aceite térmico Sigma Aldrich Z60391	1,00	43,40	43,40
MO.ING	Ingeniero químico	45,00	23,00	1.035,00
CO.AUX	Costes auxiliares 2%	0,02	1.538,08	30,76

Clase: Mano de Obra 1.035,00

Clase: Maquinaria 21,89

Clase: Material 481,19

Clase: Medio auxiliar 30,76

Total partida 01.01 1,00 1.568,84 1.615,91

01.02 Fase de curado

01.02

MAQ.HOR	Horno de ventilación forzada JP Selecta	0,01	1.000,00	10,00
MAT.PINZ	Pinzas molde 20u	1,00	11,20	11,20
MAT.TEF	Lámina de teflón para molde 3mm	0,20	7,50	1,50
MAT.PLA	Placa de vidrio molde	1,00	1,50	1,50
MAT.PAD	Papel adhesivo	1,00	2,50	2,50
MAT.PIP	Pipeta Pasteur vidrio + tetina	3,00	0,23	0,69
MAT.GUA	Guantes térmicos	0,02	25,00	0,50
MAT.VIAL	Vial 2 cm diámetro 50 caja	1,00	25,00	25,00
MAT.MOR	Mortero con mano	0,02	47,00	0,94

B	Trabajo Fin de Grado	Página: 2
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Medición	Precio	Importe
MAT.DMF	Dimetilformamida Sigma Aldrich <99% 100 ml	0,50	60,30	30,15
MAT.NAF	Naftaleno Scharlab 500g	0,50	39,00	19,50
MAT.PCL	Policaprolactona Polyscience 25g MW50000	0,60	184,00	110,40
MAT.OCT	Octano Sigma Aldrich 98% pureza	0,20	202,00	40,40
MAT.F127	Pluronic F127 Sigma Aldrich	0,20	66,20	13,24
MAT.P123	Pluronic P123 Sigma Aldrich	0,20	58,54	11,71
MAT.PMMA	Polimetil metacrilato Polyscience 250g	0,80	57,50	46,00
MAT.PEMA	Polietyl metacrilato 250g	0,80	47,80	38,24
MAT.PEO	Óxido de polietileno Polyscience 250g	0,30	132,50	39,75
MAT.PVA	Molde de alcohol polivinílico	1,00	19,00	19,00
MAT.THF	Tetrahidrofurano Sigma Aldrich	0,80	125,00	100,00
MAT.PARF	Parafina aceite Sigma Aldrich	0,60	39,10	23,46
MO.ING	Ingeniero químico	45,00	23,00	1.035,00
CO.AUX	Costes auxiliares 2%	0,02	1.580,68	31,61
	Clase: Mano de Obra			1.035,00
	Clase: Maquinaria			10,00
	Clase: Material			535,68
	Clase: Medio auxiliar			31,61
	Total partida 01.02	1,00	1.612,29	1.660,66
	Total capítulo 01			3.276,57
02	Lavado y secado de <i>scaffolds</i> de PGS			
02.01	Proceso de lavado			
02.01	MAQ.REF Equipo de reflujo con circuito de condensación	0,02	1.150,00	23,00
	MAT.ZIP Bolsas Zip caja 1000u	0,05	41,70	2,09
	MAT.PET Placa Petri vidrio	2,00	11,10	22,20
	MAT.MALL Malla nylon microperforada en rollo	0,05	53,00	2,65
	MAT.ACE Acetona Sigma Aldrich 99.5% pureza 2,5l	1,00	78,70	78,70
	MAT.MOR Mortero con mano	1,00	47,00	47,00
	MAT.AGUA Agua desionizada 25l	0,60	15,90	9,54
	MO.ING Ingeniero químico	15,00	23,00	345,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	530,18	10,60
	Clase: Mano de Obra			345,00
	Clase: Maquinaria			23,00
	Clase: Material			162,18
	Clase: Medio auxiliar			10,60
	Total partida 02.01	1,00	540,78	557,00
02.02	Proceso de secado			
02.02	MAQ.DES Desecador a vacío JP Selecta	0,01	1.440,00	14,40
	MAQ.BOM Bomba de vacío Vacuubrand	0,02	260,00	5,20
	MAT.PTR Placa Petri de plástico	10,00	0,25	2,50
	MO.ING Ingeniero químico	3,00	23,00	69,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	91,10	1,82
	Clase: Mano de Obra			69,00
	Clase: Maquinaria			19,60
	Clase: Material			2,50
	Clase: Medio auxiliar			1,82
	Total partida 02.02	1,00	92,92	95,71
	Total capítulo 02			652,71

B	Trabajo Fin de Grado	Página: 3
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Medición	Precio	Importe
03	Ensayos de caracterización			
03.01	Ensayo de densidad y porosidad			
03.01				
	MAQ.BAL Balanza Mettler Toledo AE-240	0,01	1.195,00	11,95
	MAQ.BOM Bomba de vacío Vacuubrand	0,04	260,00	10,40
	MAT.VIAL Vial 2 cm diámetro 50 caja	0,01	25,00	0,25
	MAT.OCT Octano Sigma Aldrich 98% pureza	0,10	202,00	20,20
	MO.ING Ingeniero químico	3,00	23,00	69,00
	MO.DOC Docente de investigación	3,00	17,00	51,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	162,80	3,26
	Clase: Mano de Obra			120,00
	Clase: Maquinaria			22,35
	Clase: Material			20,45
	Clase: Medio auxiliar			3,26
	Total partida 03.01	1,00	166,06	171,04
03.02	Ensayo de espectroscopia electrónica de barrido SEM			
03.02				
	MAQ.FTIR Equipo de microscopia electrónica de barrido SEM	5,00	13,00	65,00
	MAT.PTR Placa Petri de plástico	10,00	0,25	2,50
	MAT.CLL Cuchilla	1,00	0,30	0,30
	MO.ING Ingeniero químico	7,00	23,00	161,00
	MO.DOC Docente de investigación	7,00	17,00	119,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	347,80	6,96
	Clase: Mano de Obra			280,00
	Clase: Maquinaria			65,00
	Clase: Material			2,80
	Clase: Medio auxiliar			6,96
	Total partida 03.02	1,00	354,76	365,40
03.03	Ensayo de compresión			
03.03				
	MAQ.TMA Analizador termomecánico Seiko TMA SS6000	8,00	12,00	96,00
	MAT.PET Placa Petri vidrio		11,10	
	MAT.TRO Troquel 5mm diámetro	1,00	3,50	3,50
	MO.ING Ingeniero químico	14,00	23,00	322,00
	MO.DOC Docente de investigación	2,00	17,00	34,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	455,50	9,11
	Clase: Mano de Obra			356,00
	Clase: Maquinaria			96,00
	Clase: Material			3,50
	Clase: Medio auxiliar			9,11
	Total partida 03.03	1,00	464,61	478,55
03.04	Ensayo de análisis químico			
03.04				
	MAT.CRO Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A	4,00	12,00	48,00
	MAT.DMF Dimetilformamida Sigma Aldrich <99% 100 ml	0,01	60,30	0,60
	MO.ING Ingeniero químico	8,00	23,00	184,00
	MO.DOC Docente de investigación	8,00	17,00	136,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	368,60	7,37
	Clase: Mano de Obra			320,00
	Clase: Maquinaria			48,00
	Clase: Material			0,60
	Clase: Medio auxiliar			7,37
	Total partida 03.04	1,00	375,97	387,25
	Total capítulo 03			1.402,24

B	Trabajo Fin de Grado	Página: 4
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Medición	Precio	Importe
04	Limpieza de material de laboratorio			
04.01	Lavado de material de laboratorio			
04.01	MAT.EOH Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza	2,00	10,20	20,40
	MAT.ACE Acetona Sigma Aldrich 99.5% pureza 2,5l	5,00	78,70	393,50
	MAT.AGUA Agua desionizada 25l	0,80	15,90	12,72
	MO.ING Ingeniero químico	25,00	23,00	575,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	1.001,62	20,03
	Clase: Mano de Obra			575,00
	Clase: Material			426,62
	Clase: Medio auxiliar			20,03
	Total partida 04.01	1,00	1.021,65	1.052,30
	Total capítulo 04			1.052,30
05	Reuniones			
05.01	Reuniones de gestión del trabajo			
05.01	MO.DIR Director del proyecto	18,00	26,00	468,00
	MO.DOC Docente de investigación	18,00	17,00	306,00
	MO.ING Ingeniero químico	18,00	23,00	414,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	1.188,00	23,76
	Clase: Mano de Obra			1.188,00
	Clase: Medio auxiliar			23,76
	Total partida 05.01	1,00	1.211,76	1.248,11
05.02	Reuniones periódicas			
05.02	MO.DIR Director del proyecto	5,00	26,00	130,00
	MO.DOC Docente de investigación	15,00	17,00	255,00
	MO.ING Ingeniero químico	20,00	23,00	460,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	845,00	16,90
	Clase: Mano de Obra			845,00
	Clase: Medio auxiliar			16,90
	Total partida 05.02	1,00	861,90	887,76
05.03	Redacción y revisión del trabajo			
05.03	MO.DIR Director del proyecto	15,00	26,00	390,00
	MO.DOC Docente de investigación	15,00	17,00	255,00
	MO.ING Ingeniero químico	100,00	23,00	2.300,00
	CO.AUX Costes auxiliares 2%	0,02	2.945,00	58,90
	Clase: Mano de Obra			2.945,00
	Clase: Medio auxiliar			58,90
	Total partida 05.03	1,00	3.003,90	3.094,02
	Total capítulo 05			5.229,89

B	Trabajo Fin de Grado	Página: 5
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

06 Equipos de protección individual y seguridad

06.01 Material de protección individual

06.01

MAT.GULA	Caja de guantes de látex	1,00	12,60	12,60
MAT.GUNI	Caja de guantes de nitrilo	1,00	12,60	12,60
MAT.BAT	Bata de laboratorio	1,00	14,90	14,90
MAT.MGA	Máscara de gases	1,00	29,50	29,50
MAT.GAI	Gafa integral	1,00	5,77	5,77
CO.AUX	Costes auxiliares 2%	0,02	75,37	1,51

Clase: Material 75,37
Clase: Medio auxiliar 1,51

Total partida 06.01 1,00 76,88 79,19

Total capítulo 06 79,19

Total presupuesto 11.692,90

C	Trabajo Fin de Grado	Página: 1
	PRESUPUESTO RESUMIDO	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Medición	Precio	Importe
01	Síntesis de PGS			
01.01	Fase de prepolimerización optimizada	1,00	1.615,91	1.615,91
01.02	Fase de curado	1,00	1.660,66	1.660,66
	Total Capítulo 01			3.276,57
02	Lavado y secado de films de PGS			
02.01	Proceso de lavado	1,00	557,00	557,00
02.02	Proceso de secado	1,00	95,71	95,71
	Total Capítulo 02			652,71
03	Ensayos de caracterización			
03.01	Ensayo de densidad y porosidad	1,00	171,04	171,04
03.02	Ensayo de espectroscopia electrónica de barrido SEM	1,00	365,40	365,40
03.03	Ensayo de compresión	1,00	478,55	478,55
03.04	Ensayo de análisis químico	1,00	387,25	387,25
	Total Capítulo 03			1.402,24
04	Limpieza de material de laboratorio			
04.01	Lavado de material de laboratorio	1,00	1.052,30	1.052,30
	Total Capítulo 04			1.052,30
05	Reuniones			
05.01	Reuniones de gestión del trabajo	1,00	1.248,11	1.248,11
05.02	Reuniones periódicas	1,00	887,76	887,76
05.03	Redacción y revisión del trabajo	1,00	3.094,02	3.094,02
	Total Capítulo 05			5.229,89
06	Equipos de protección individual y seguridad			
06.01	Material de protección individual	1,00	79,19	79,19
	Total Capítulo 06			79,19
	Total Presupuesto			11.692,90

D	Trabajo Fin de Grado	Página: 1
	RESUMEN DE CAPITULOS	
	Desarrollo del proceso de fabricación de <i>scaffolds</i> de PGS	Fecha: 11/07/16

Nº Orden	Código	Descripción de los capítulos	Importe
01	01	Síntesis de PGS	3.276,57
02	02	Lavado y secado de films de PGS	652,71
03	03	Ensayos de caracterización	1.402,24
04	04	Limpieza de material de laboratorio	1.052,30
05	05	Reuniones	5.229,89
06	06	Equipos de protección individual y seguridad	79,19
TOTAL EJECUCIÓN MATERIAL			11.692,90
13 % Gastos Generales			1.520,08
6 % Beneficio Industrial			701,57
TOTAL EJECUCIÓN POR CONTRATA			13.914,55
21 % I.V.A.			2.922,06
TOTAL PRESUPUESTO C/IVA			16.836,61

Asciende el presupuesto proyectado, a la expresada cantidad de:
DIECISEIS MIL OCHOCIENTOS TREINTA Y SEIS EUROS CON SESENTA Y UN CÉNTIMOS

11 de Julio de 2016

ANEXOS

ANEXO I. TABLAS DE PROPIEDADES Y DATOS EXPERIMENTALES

Tabla 1.1. Propiedades de los porógenos para la fabricación de *scaffolds* de PGS.

Porógeno	Naturaleza	PM (g/mol)	Densidad (g/cm ³)	Pto. Ebu (°C)	Cte. Ebullo (K/(mol/L))	Pto. Fusión (°C)
Tipo 1: Porógeno de sustancia pura						
N,n-Dimetilformamida (DMF)	Líquido	73	0,994	153	n/a	n/a
Naftaleno	Pellets	128	1,160	218	n/a	80
Tipo 2 :Porógeno a partir de mezcla de sustancias con punto de ebullición < 130 °C						
n-octano	Líquido	114	0,703	125.7 (+4,3°C)	4	n/a
1,4-Dioxano	Líquido	88	1,033	101.1 (+28,9°C)	3,01	n/a
Tipo 3: Hidrocarburo como porógeno						
Parafina	Líquido	n/a	0,89	370	n/a	n/a
Tipo 4: Polímeros como porógenos						
Policaprolactona (PCL)	Pellets	50000	1,145	n/a	n/a	60
Pluronic P123	Cera	n/a	1,018	>149	n/a	-25
Pluronic F127	Polvo	n/a	1,095	>149	n/a	-25
Poli(metil metacrilato) (PMMA)	Esferas (126-150µm)	350000	1,190	n/a	n/a	130-140
Poli(etil metacrilato) (PEMA)	Esferas (125-180µm)	250000	1,510	n/a	n/a	
Óxido de polietileno (PEO)	Polvo	100000	1,130	n/a	n/a	127
Alcohol polivinílico (PVA)	Sólido	86	1,269	n/a	n/a	200

Tabla 1.2. Propiedades de los reactivos para la síntesis de PGS.

Reactivo	Naturaleza	Peso Molecular (g/mol)	Densidad (g/cm ³)	Pureza (%)
Ácido sebácico	Polvo	202,25	1,210	99
Glicerol	Líquido	92,09	1,260	>99,5%

Tabla 1.3. Propiedades de las sustancias utilizadas para el proceso de síntesis de PGS.

Sustancia	Naturaleza	Densidad (g/cm ³)	Pto. Ebullición (°C)
Tetrahidrofurano (THF)	Líquido	0,89	65
Etanol	Líquido	0,79	78
Acetona	Líquido	0,79	56
Aceite (Z603910)	Líquido	n/a	260

Tabla 1.4. Datos experimentales para la separación de fases mediante porógeno tipo 1.

Porógeno	Experiencia	Réplica	Porógeno (g)	PGS (g)
DMF	1	1	16,2	3,03
		2	16,18	2,98
	2	1	16,19	3,01
		2	16,21	3,00
Naftaleno	1	1	9,92	1,54
		2	9,96	1,51

Tabla 1.5. Datos experimentales para la separación de fases mediante porógeno tipo 2.

Porógeno	Experiencia	Réplica	Porógeno (g)	PGS (g)
Octano + naftaleno	1	1	6,77	1,52
		2	6,7	1,54

Tabla 1.6. Datos experimentales para la separación de fases mediante porógeno tipo 3.

Porógeno	Experiencia	Réplica	Porógeno (g)	PGS (g)
Parafina	1	1	7,64	1,54
		2	7,63	1,5
	2	1	7,63	1,51
		2	7,61	1,49
	3	1	4,77	1,48
		2	4,74	1,51
	4	1	1,94	1,51
		2	1,92	1,58

Tabla 1.7. Datos teóricos para la separación de fases mediante PCL, porógeno tipo 4.

Porógeno	Experiencia	Réplica	Porógeno (g)	PGS (g)	Acetona (g)
PCL	1	1	9,82	1,52	88,52
		2	9,84	1,51	88,53

Tabla 1.8. Datos experimentales para la separación de fases mediante P123, F127 y PEO, porógenos tipo 4.

Porógeno	Experiencia	Réplica	Porógeno (g)	PGS (g)
P123	1	1	5,48	1,54
		2	5,42	1,54
	2	1	2,23	1,58
		2	2,23	1,62
F127	1	1	3,53	1,58
		2	4	1,53
PEO	1	1	6,08	1,54
		2	6,04	1,5
	2	1	2,51	1,48
		2	2,43	1,51

Tabla 1.9. Datos teóricos para *particulate leaching* con PMMA y PEMA, porógenos tipo 4.

Porógeno	Experiencia	Réplica	Porógeno (g)	PGS (g)	THF+PGS (g)
PMMA	1	1	6,39	1,5	0
		2	6,37	1,49	0
	2	1	2,6	1,59	0
		2	2,55	1,48	0
	3	1	6,37	1,59	2,05
		2	6,46	1,52	1,96
	4	1	2,6	1,554	2,22
		2	2,56	1,491	2,13
	5	1	0,68	1,498	2,14
		2	0,68	1,484	2,12
	6	1	2,57	1,49	2,98
		2	2,6	1,54	3,08
		3	2,6	1,495	2,99
		4	2,56	1,505	3,01

Tabla 1.10. Datos teóricos para *particulate leaching* con PMMA y PEMA, porógenos tipo 4.

Porógeno	Experiencia	Réplica	Porógeno (g)	PGS (g)	THF+PG(g)
PMMA	1	1	8,08	1,5	n/a
		2	8,12	1,55	0,36
	2	1	3,24	1,53	n/a
		2	3,25	1,51	n/a
	3	1	6,42	1,51	0,45
		2	6,42	1,49	0,46
	4	1	3,26	1,505	2,15
		2	3,24	1,505	2,15
	5	1	0,85	1,512	2,16
		2	0,83	1,512	2,16
	6	1	3,26	1,505	3,01
		2	3,24	1,51	3,02
		3	2,6	1,495	2,99
		4	2,56	1,505	3,01

Tabla 1.11. Resultados experimentales del ensayo de densidad y porosidad de la muestra A1.

Muestra A1	m	mi	ms	Densidad	Porosidad
1	0,03779	0,11191	0,01550	1,192	76,88 %
2	0,03912	0,11164	0,01591	1,185	75,75 %
3	0,06859	0,14062	0,02659	1,148	63,17 %

Tabla 1.12. Resultados experimentales del ensayo de densidad y porosidad de la muestra A2.

Muestra A2	m	mi	ms	Densidad	Porosidad
1	0,04245	0,09050	0,01675	1,161	65,15 %
2	0,03591	0,08495	0,01378	1,141	68,91 %
3	0,03189	0,07621	0,01247	1,154	69,53 %

Tabla 1.13. Resultados experimentales del ensayo de densidad y porosidad de la muestra B1.

Muestra B1	m	mi	ms	Densidad	Porosidad
1	0,02391	0,05826	0,00981	1,192	70,90 %
2	0,05981	0,10702	0,02441	1,188	57,15 %
3	0,04991	0,10050	0,01998	1,172	62,83 %

Tabla 1.14. Resultados experimentales del ensayo de densidad y porosidad de la muestra 3D.

Muestra 3D	m	mi	ms	Densidad	Porosidad
1	0,03942	0,08884	0,01286	1,043	65,04 %
2	0,05603	0,13669	0,01674	1,003	67,24 %
3	0,06691	0,14849	0,02254	1,060	64,77 %

Tabla 1.15. Densidades experimentales y medias obtenidas del ensayo de densidad.

	Densidad experimental (g/cm ³)			Densidad media (g/cm ³)
Scaffold A	1,192	1,185	1,148	1,164 (±0,021)
	1,161	1,141	1,154	
Scaffold B	1,192	1,188	1,172	1,184 (±0,010)
Scaffold 3D	1,043	1,003	1,060	1,035 (±0,030)

Tabla 1.16. Porosidades experimentales y medias obtenidas del ensayo de porosidad.

	Porosidad experimental			Porosidad experimental media
Scaffold A	76,88%	75,75%	63,17%	69,90 % ($\pm 0,08$)
	65,15%	68,91%	69,53%	
Scaffold B	70,90%	57,15%	62,83%	63,62 % ($\pm 0,02$)
Scaffold 3D	65,04%	67,24%	64,77%	65,69 % ($\pm 0,01$)

Tabla 1.17. Porosidades estimadas experimentales de los *scaffolds* fabricados con PMMA.

	Porosidad estimada		Porosidad estimada media
Scaffold A	62,26 %	61,75 %	62,10 % ($\pm 0,001$)
	62,45 %	61,93 %	
Scaffold B	61,54 %	62,15 %	61,84 % ($\pm 0,001$)

ANEXO II. FICHAS DE SEGURIDAD

Tabla 2.1. Pictogramas, frases H y P de los porógenos peligrosos utilizados.









Compuesto	N,N-Dimetilformamida	Nº CAS	68-12-2
Pictogramas			
Frases H	Frases P		
H226, H312 + H332, H319, H360D	P201, P280, P305 + P351 + P338, P308 + P313		
Compuesto	Naftaleno	Nº CAS	109-99-9
Pictogramas			
Frases H	Frases P		
H302, H319, H335, H351, H302, H319, H335, H351	P210, P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338, P370 + P378, P403+P235, P210, P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338, P370+P378, P403+P235		
Compuesto	n-Octano	Nº CAS	111-65-9
Pictogramas			
Frases H	Frases P		
H225, H304, H315, H336, H410	P210, P261 P273, P301+P310, P331, P501		

Tabla 2.1. Pictogramas, frases H y P de las sustancias peligrosas utilizadas.

Compuesto	Tetrahidrofurano	Nº CAS	109-99-9
Pictogramas			
Frases H	Frases P		
H302, H319, H335, H351, H302, H319, H335, H351	P210, P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338, P370 + P378, P403+P235, P210, P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338, P370+P378, P403+P235		
Compuesto	Etanol	Nº CAS	64-17-5
Pictogramas			
Frases H	Frases P		
H225	P210, R11		
Compuesto	Acetona	Nº CAS	67-64-1
Pictogramas			
Frases H	Frases P		
H225, H319, H336,	P210, P261, P305, P351, P338, R11, R36, R66, R67		

ANEXO III. INFORME TÉCNICO

	UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA		Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular Universidad Politécnica de Valencia
Informe técnico de obtención de Poli (Glicerol Sebacato)			
Fecha Inicio:	Fecha Fin:	Operario:	Lote:

tapa 1 de Síntesis: Prepolimerización

-Comprobación limpieza de Balón	
-Introducción del imán	
-Tarado de la bascula	
- Masa de Glicerol	g
- Masa Ácido Sebacico	g
- Masa Total	g
-Comprobación sellado de las vías con vaselina	
-Comprobar vía Nitrógeno y ajuste de presión	

-Condiciones de reacción

- Presión	1 atm
- Temperatura para fundido	130 °C
- Tiempo de fundido	min
- Temperatura reacción	130 °C
- Hora de inicio de prepol	h
- Hora de finalización de prepol	h

-Observaciones:

tapa 2 de Síntesis: Postpolimerización

Porógenos a añadir para porosidad del %:

Solvente	Teorico	Real
-	g	g
-	g	g
-	g	g
-	g	g
-	g	g
-	g	g
-	g	g
-	g	g
-	g	g

- Temperatura para fundido porógenos	°C
- Tiempo de fundido porogenos	min
- Temperatura mezclado PGS+Porógeno	°C
-Tiempor mezclado PGS+Porógeno	min
- Temperatura de curado	130 °C
- Hora de inicio del curado	h
- Hora de finalización de curado	h
- Poner el Balón con THF para limpieza	
- Vía de Nitrógeno cerrada	

-Cálculos y observaciones: