



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Uso del DSC, TGA y turbidimetría para determinar la presencia de contaminantes inorgánicos en recombinaómeros tipo elastina (ELRs)

Autora:

Raquel Sánchez Martínez

Tutores:

Dr. Israel González de Torre

Dr. Luis Debán Miguel

Departamento de Química Analítica

ÍNDICE

1. LISTADO DE ABREVIATURAS	3
2. BREVE RESUMEN DEL TRABAJO, EN ESPAÑOL Y EN INGLÉS	4
3. INTRODUCCIÓN BREVE SOBRE LOS ANTECEDENTES Y EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA	5
3.1. La elastina y los polímeros tipo elastina	5
3.2. Naturaleza termosensible y comportamiento de autoensamblaje de los ELR	7
3.3. Métodos de análisis.....	10
3.3.1. Análisis térmico.....	10
3.3.1.1. Análisis termogravimétrico (TGA)	10
3.3.1.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	12
3.3.2. Turbidimetría.....	14
3.4. Polímero de estudio	15
4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Materiales	18
5.2. Equipos.....	19
5.3. Compuestos	21
5.4. Software	22
5.5. Métodos.....	22
5.5.1. Análisis termogravimétrico (TGA).....	22
5.5.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	23
5.5.3. Turbidimetría.....	25
6. RESULTADOS	28
6.1. Análisis termogravimétrico (TGA).....	28
6.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	29
6.3. Turbidimetría.....	32

7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIONES	38
9. BIBLIOGRAFÍA	39
10. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	43
11. ANEXOS	45
11.1. Análisis termogravimétrico (TGA)	45
11.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	48
11.3. Turbidimetría.....	66

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

ELP	Elastin Like Polymers
ELR	Elastin Like Recombinamers
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
TGA	Análisis Termogravimétrico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
IR	Infrarrojo
T _t	Temperatura de transición
mL	Mililitros
μL	Microlitros
mg	Miligramos
mQ	miliQ

2. BREVE RESUMEN DEL TRABAJO, EN ESPAÑOL Y EN INGLÉS

RESUMEN

El trabajo, vinculado a la actividad científica del BIOFORGE, está relacionado con la obtención y desarrollo de biomateriales con amplias aplicaciones en el campo de la medicina y trata sobre la determinación y cuantificación de las impurezas inorgánicas (principalmente en forma de NaCl) que ocasionalmente pueden encontrarse en el ELR VKVx24, que es un recombinámero de tipo elastina bioproducido a través de un proceso de fermentación con bacterias *Escherichia coli*. Estas bacterias fueron previamente modificadas genéticamente para introducir el código de ADN que dé lugar al ELR deseado. Se ha conseguido correlacionar la pureza del ELR estudiado con su temperatura de transición mediante tres técnicas analíticas: análisis termogravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y turbidimetría, siendo esta correlación también extrapolable a otros ELRs. Es la primera vez que se hace esta correlación con este tipo de polímeros. Es una herramienta útil y rápida para poder conocer el grado de pureza de un ELR y la efectividad conseguida en los procesos de obtención y de purificación del mismo. Además, también permite, a través de la modificación de la concentración de sal, obtener la temperatura de transición del ELR deseada dependiendo del uso que se le vaya a dar.

ABSTRACT

The work, linked to the scientific activity of BIOFORGE, is related to the obtaining and development of biomaterials with wide applications in the field of medicine and addresses the determination and quantification of inorganic impurities (principally in the form of NaCl) that eventually could be found on the ELR VKVx24, which is an Elastin Like Recombinamer bioproduced through a fermentation process on *Escherichia coli*. These bacteria were previously genetically modified to include the DNA code that will result on the desire ELR. The purity of the ELR studied was correlated with its transition temperature through three analytical techniques: Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and turbidimetry, being this correlation also comparably to other ELRs. This is the first time that such correlation has been done with this kind of polymers. It is a useful and quick tool to know the degree of purity of an ELR and the effectiveness achieved in the processes of obtaining and purifying it. In addition, it also allows, modifying the concentration of the salt, to obtain the wanted ELR transition depending on the use that is going to be given to it.

3. INTRODUCCIÓN BREVE SOBRE LOS ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Los biopolímeros son macromoléculas presentes en los seres vivos [1]. Debido a las nuevas disciplinas médicas emergentes, como es el caso de la ingeniería de los tejidos, también se incluyen los materiales sintéticos como biopolímeros y presentan la característica de ser biocompatibles con el ser vivo, normalmente con el ser humano. Las proteínas son una de las familias de los biopolímeros [2].

Según los tipos de análisis que se realizan sobre polímeros proteicos en el laboratorio, el criterio que vamos a seguir con respecto a la determinación de las impurezas es el siguiente:

- a) Impurezas de naturaleza inorgánica, como por ejemplo el NaCl o el Na₃PO₄, debido a la utilización de estas sustancias en la producción del polímero. Este tipo de impurezas se determinan mediante análisis termogravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y turbidimetría, como se verá en este trabajo.
- b) Impurezas proteicas como los aminoácidos, que pueden ser analizadas de manera habitual por cromatografía, HPLC o electroforesis.
- c) Impurezas de compuestos orgánicos que se detectan mediante RMN e IR.

Estas impurezas pueden modificar propiedades de los polímeros: flexibilidad, resistencia, rigidez, viscosidad, coloración, biodegradabilidad, combustión, resistencia a altas temperaturas y al deterioro del polímero [3].

3.1. La elastina y los polímeros tipo elastina

La elastina es una proteína que forma parte de la matriz extracelular. Su principal función biológica es proporcionar elasticidad a los tejidos, aunque también presenta un papel importante en la regulación del comportamiento celular y en la reparación de los tejidos del organismo [4]. La secuencia de aminoácidos de la elastina tiene una serie de zonas regidas por la existencia de repetición de motivos (secuencias de aminoácidos) como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG, los cuales alcanzan una estructura que permite a la elastina sufrir grandes deformaciones sin que se produzca su ruptura y que una vez que ha desaparecido la tensión, ésta recupera su conformación original. Este proceso ocurre sin perder energía debido a que la

energía necesaria para el estiramiento de la proteína es recuperada cuando vuelve a su forma inicial [5].

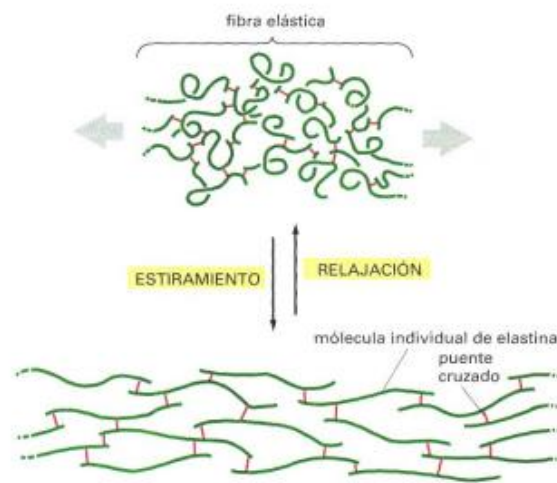


Figura 1. Estiramiento de una red de moléculas de elastina

Cuando la elastina está en disolución acuosa posee la capacidad de pasar a un estado ordenado, en el que aparece con una conformación plegada, desde uno desordenado, en el que la presenta estirada, debido a un aumento de la temperatura. Esta propiedad tan especial de la elastina es la responsable del interés que ha generado en la comunidad de científicos originando la creación de gran variedad de polímeros tipo elastina [6].

Los polímeros tipo elastina (ELP, “Elastin Like Polymers”) son polipéptidos obtenidos artificialmente cuya secuencia de aminoácidos reproduce los motivos repetidos que presenta la elastina natural. Los más utilizados presentan repeticiones del motivo $(VPGXG)_n$, donde “X”, denominado residuo invitado, puede ser cualquier aminoácido salvo prolina, y donde el subíndice “n” representa el número de repeticiones del pentapéptido [7][8]. El avance que se ha producido en las técnicas de biología molecular ha permitido la creación de genes sintéticos, los cuales son diseñados de manera específica para realizar una determinada función. Al introducir en un microorganismo un gen concreto se puede obtener el polímero recombinante que se quiera y con un completo control de su secuencia. De modo que, los ELP obtenidos sintéticamente se les denomina ELR (“Elastin Like Recombinamers”) [9]. Se les atribuye este nombre para recordar tres características por las que se les distingue:

- 1) Su semejanza con la proteína elastina
- 2) Su obtención recombinante
- 3) Su condición de polímero

Los ELR presentan las propiedades de la elastina además de unas propiedades propias debido a que han sido diseñados de manera específica. Por lo tanto, la semejanza que presentan la elastina y los ELR en la secuencia de aminoácidos se convierte en poseer propiedades parecidas como son: las propiedades mecánicas [10][11], la capacidad de actuar con una respuesta adecuada al medio biológico en el que se encuentren (biocompatibles) [12]–[15], la respuesta a los cambios de temperatura (termosensibles) y el autoensamblaje [16], considerando estas dos últimas las de mayor importancia.

3.2. Naturaleza termosensible y comportamiento de autoensamblaje de los ELR

La elastina y por lo tanto los ELR debido a variaciones de la temperatura experimentan una transición molecular reversible entre dos estados conformacionales (figura 2). Cuando estén en una disolución acuosa que se encuentre a una temperatura inferior a la temperatura de transición (T_t), el polímero estará disuelto o hidratado mediante hidratación hidrófoba (figura 2) caracterizada por la presencia de estructuras tipo clatrato alrededor de los residuos apolares del polímero (figura 3.A) [4][17]. Por el contrario, si se alcanza una temperatura superior a la de transición, las moléculas de agua que estaban alrededor de los restos apolares se desordenan debido a la agitación térmica dando lugar a que la estructura del agua formando los clatratos desaparezca y la cadena de polipéptidos se pliegue hidrofóbicamente adquiriendo una estructura regular denominada espiral β (figura 2), formada principalmente por una sucesión de horquillas β (figura 3.B) [18]. Si se sigue aumentando la temperatura los ELR adquieren estructuras más ordenadas debido a un desplegamiento y desnaturalización, como ocurre en la mayoría de las proteínas.

La T_t depende de la masa molecular, de la polaridad media del polímero y de la presencia en la disolución de otros iones y moléculas [19].

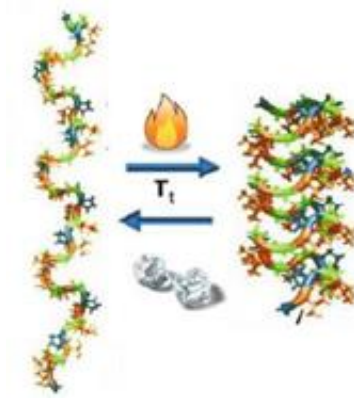


Figura 2. Cambios en la estructura de los ELR en la transición inversa. Cadena extendida con estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de la cadena del polímero, y cadena plegada, con la horquilla β que forman los aminoácidos de la cadena del polímero por encima de la T_i de cada proceso

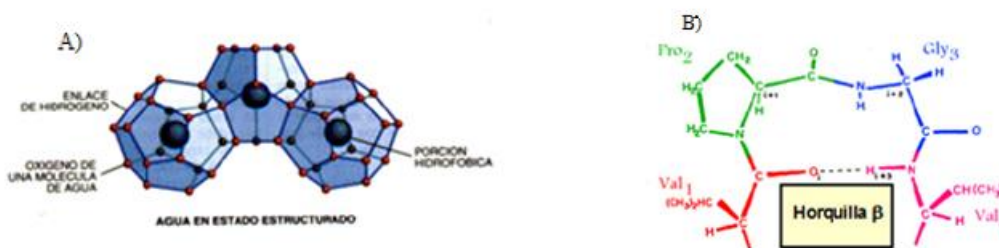


Figura 3. A: Representación de la estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de restos apolares. B: Esquema con la posición de los principales átomos que participan en la conformación en horquilla β de los polímeros tipo elastina

Las aplicaciones por este comportamiento son la activación, detección y purificación de estos polímeros [20][21].

Algunos ELR anfipáticos presentan la capacidad de formar nanopartículas o hidrogeles dependiendo de la concentración del polímero, alta concentración para el primer caso y baja para el segundo, y también son capaces de actuar con una respuesta adecuada al medio biológico en el que se encuentren.

Si se estudia este proceso desde el punto de vista termodinámico hay que tener en cuenta el sistema de una manera global. Durante el proceso de calentamiento se produce un plegamiento

hidrofóbico del polímero lo que da lugar a un aumento local del orden. Sin embargo, la magnitud de este orden va a ser mucho menor que la debida al desorden provocado por la ruptura de las estructuras de clatrato, que se ha producido debido a la agitación térmica, y esto ha dado lugar a un aumento de la entropía ($\uparrow\uparrow\Delta S > 0$) siendo ésta la fuerza que da origen al plegamiento, haciendo posible que la energía libre de Gibbs sea negativa ($\Delta G < 0$), siendo el plegamiento del polímero un proceso espontáneo.

Para provocar el proceso inverso, la cantidad de energía térmica que se necesita depende de la relación que haya entre la cadena del polímero y el agua, la cual puede ajustarse mediante una serie de parámetros como son: la longitud de ELR, la composición de aminoácidos [22], la concentración del polímero [23], la fuerza iónica [24] o el pH [25], dando lugar a clatratos que presenten distintos grados de perfección. Por lo tanto, cuando se define una determinada T_t estas variables deben ser tenidas en cuenta.

Considerando todo lo que se ha descrito anteriormente, el proceso de contracción que es provocado por estímulos ambientales puede ser considerado como la transformación de energía química o térmica en trabajo mecánico útil. Además, si se produce una disminución de la temperatura por debajo de la T_t ese plegamiento es totalmente reversible por lo que los ELR pueden considerarse “polímeros inteligentes” [26] ya que tienen la capacidad de sentir el microambiente y experimentar cambios en reacción a él.

Los ELR se han convertido en compuestos de gran interés en el campo de la investigación de la biomedicina, la nanotecnología y la biotecnología [7], [9], [27]–[31] debido al nivel de conocimiento que se ha alcanzado con relación a la estructura que presenten y a la función que realicen al presentar propiedades mecánicas, ser biocompatibles y tener una naturaleza inteligente. La ingeniería de tejidos fue la primera área en la que estos polímeros tuvieron aplicación [32]–[34]. Sin embargo, se están desarrollando otra serie de aplicaciones para ellos como la purificación de proteínas [11], dosificación de fármacos, terapias génicas (gene delivery), nanovacunas [35], biocompatibilización de superficies [36].

3.3. Métodos de análisis

3.3.1. Análisis térmico

Al conjunto de técnicas de análisis que están basadas en medir la relación dinámica entre la temperatura y alguna relación de la materia es lo que se conoce como análisis térmico [37].

Con este tipo de análisis puede conseguirse información sobre transformaciones químicas y/o físicas, y propiedades de una muestra que está siendo sometida a variaciones de temperatura. También se puede controlar e identificar la pureza y la estabilidad de las sustancias debido a que las transiciones entre estados se producen a temperaturas específicas para cada una de ellas [38].

El análisis térmico del polímero del presente trabajo se ha realizado a través de análisis termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

3.3.1.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

Esta técnica se basa en medir la variación de la masa de una muestra (puede ser como ganancia o como pérdida) cuando sufre un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. De este modo se obtiene información sobre si la muestra reacciona con otros componentes o si por el contrario se descompone [39]. Para obtener información complementaria sobre el comportamiento térmico de una muestra se utiliza el análisis termogravimétrico junto con otras técnicas, como por ejemplo, con DSC.

Este método se caracteriza por registrar el peso de la muestra a través de una termobalanza en función de la temperatura, variar la temperatura desde la temperatura ambiente hasta los 120°C, obtener la representación de un termograma, y aportar información tanto cuantitativa como cualitativa de la muestra. Sin embargo, no da información sobre la composición química de la muestra que se estudia ni identifica los cambios térmicos que no están relacionados con variaciones en la masa como es el caso de la transición vítrea y de la cristalización.

Hay otros tipos de análisis termogravimétrico, los conocidos como análisis termogravimétrico diferencial en los cuales se representa la variación de la masa o derivada de la masa con respecto

a la temperatura, en el caso de los experimentos dinámicos, o con respecto al tiempo, en el caso de los isotermos. (figura 4).

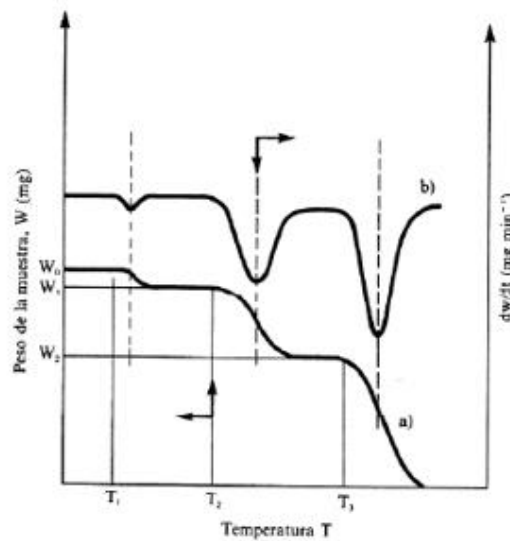


Figura 4. Termogramas: a) convencional (curva inferior, eje izquierdo), b) diferencial (curva superior, eje derecho)

Los componentes de los que consta un instrumento moderno de análisis termogravimétrico son:

- un horno,
- una balanza analítica sensible,
- un sistema de gas de purga que proporciona una atmósfera inerte o reactiva según lo que sea necesario, y
- finalmente, para controlar el instrumento, registrar y visualizar los datos, es necesario un microprocesador. También cabe la probabilidad de añadir un sistema para que se pueda llevar a cabo el cambio del gas de purga en las aplicaciones en las cuales el gas deba ser cambiado mientras se lleva a cabo el experimento.

Una de las aplicaciones más importantes del análisis termogravimétrico es el estudio de los polímeros. A través de los termogramas se obtiene información sobre los mecanismos mediante los cuales las preparaciones de polímeros se descomponen, siendo los tipos de descomposición característicos de cada tipo de polímero (figura 5) y en algunas ocasiones se utilizan para identificar al polímero.

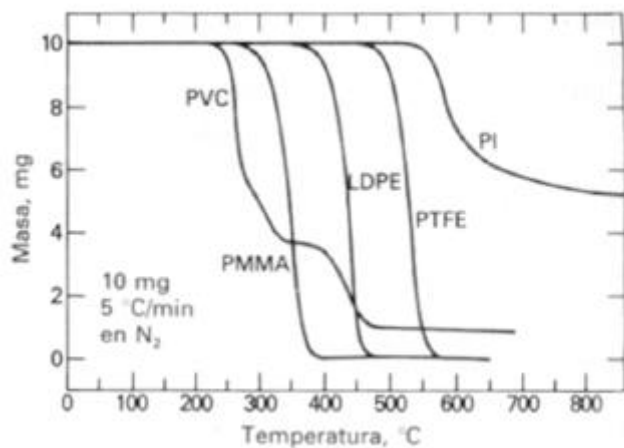


Figura 5. Termogramas correspondientes a la descomposición de cinco polímeros

3.3.1.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Esta técnica está basada en conseguir mantener el mismo valor de temperatura en la muestra y en la referencia cuando ambas son sometidas a procesos de enfriamiento o calentamiento, los cuales pueden ser isotérmicos, dinámicos o una combinación de ambos [40].

Para llevar a cabo esta técnica se necesita un horno que disponga de un sensor de alta sensibilidad, en el que se van a depositar el crisol con la muestra y el crisol de referencia. Como las reacciones químicas y los cambios físicos conllevan siempre una absorción de energía, el equipo mide las diferencias de flujo de calor que son necesarias para conseguir continuamente la misma temperatura en ambos crisoles.

En el esquema de un aparato DSC (figura 6) se observa la disposición de la célula que contiene la muestra y la que contiene la referencia. Las dos disponen de manera independiente de un sensor que irá midiendo la temperatura en cada momento y una resistencia para calentarlas. Las resistencias mantienen las células a una temperatura fijada (T_p). Las temperaturas que alcanzan en cada instante cada una de las células, la de la muestra T_m y la de referencia (T_R) se están midiendo constantemente y comparando con el valor T_p . La forma de trabajar del sistema es conocer constantemente la energía suministrada a cada célula a través de cada resistencia en función de la diferencia de temperaturas T_m y T_R , y T_p , es decir,

$$E_m = W_m (T_m - T_p)$$

$$E_R = W_R (T_R - T_p)$$

donde E_m y E_R son las energías aportadas por las resistencias y W_m y W_R son unas constantes del sistema que dependen de la masa y de la capacidad calorífica del material. La cantidad representada gráficamente en función de la temperatura (T_m , T_R o T_p) o en función del tiempo manteniendo constante la temperatura, es la diferencia entre las energías E_m y E_R . Son lo que se conocen como termogramas [37].

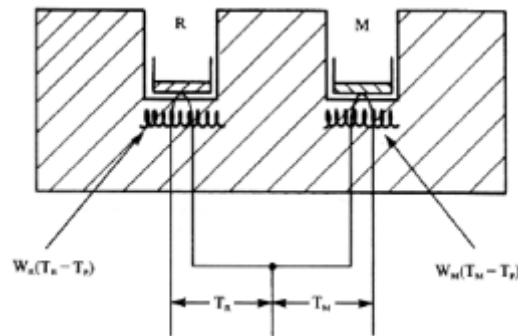


Figura 6. Esquema de un aparato de DSC

Previamente se debe realizar un calibrado, que será distinto para cada velocidad de enfriamiento y calentamiento debido a que las temperaturas registradas son las de las propias células metálicas.

Hay dos tipos de ensayos:

- a) Isotermo: en este caso se logra obtener la variación de flujo de calor en función del tiempo calentando la muestra hasta que alcance una determinada temperatura, la cual se mantendrá constante durante todo el ensayo.
- b) Dinámico: en este caso se consigue la variación de flujo de calor de la muestra calentándola y enfriándola de manera constante.

La mayor utilidad aportada por el DSC es la rapidez y facilidad con la que puede detectar la transición de los materiales. Se aplica para:

- Analizar y comprender cualquier tipo de polímero es importante conocer su transición vítrea
- Estudiar los cambios de fase y el grado de pureza de metales, cristales líquidos, productos farmacéuticos y orgánicos
- Conocer la entalpía y capacidad calorífica de un material cuando se va a realizar una destilación del material y de este modo conocer el grado de eficacia del proceso.

Todas estas razones hacen del DSC la técnica de análisis térmico más utilizada en calidad e investigación y desarrollo (I+D), en el control de procesos y en laboratorios de análisis [41]. Por lo general el intervalo de temperaturas en el que puede trabajar el DSC va desde la temperatura que tiene el nitrógeno líquido hasta unos 600°C, por lo que esta técnica se utiliza para determinar los materiales que sufren sus transiciones térmicas dentro de dicho intervalo de temperatura, como es el caso de los polímeros. Para este tipo de compuestos puede determinarse la temperatura de fusión y la de transición vítrea; reacciones de polimerización y compatibilidad de polímeros.

3.3.2. Turbidimetría

La turbidez es un término que denota una medida que indica el grado de transparencia de un líquido, debido a la presencia de sólidos en la disolución [38].

La turbidimetría es una técnica que mide, con ayuda de un espectrofotómetro de UV o Visible, la cantidad de radiación transmitida al atravesar una suspensión de partículas. Se realiza una comparación entre la intensidad del rayo incidente y el que sale de la disolución. Se mide la transmitancia (T) [42].

Para llevar a cabo la obtención de la concentración de partículas en suspensión, se vierte ésta en una cubeta y se realiza la medición de la energía que incide y de la que se trasmite. Normalmente se utiliza como fuente de radiación una lámpara de wolframio y se mide a longitudes de onda del orden de 350 nm.

Las aplicaciones de esta técnica son muy variadas: laboratorios clínicos, de analítica y en plantas de procesamiento. Además, se puede utilizar para muestras sólidas transparentes, líquidas y gaseosas. Cuando se originan precipitados gelatinosos o de tamaño muy pequeño de partícula, que presentan dificultad en ser filtrados, proporcionan suspensiones ideales para llevar a cabo las técnicas que se basan en la dispersión de la luz en lugar de utilizar técnicas gravimétricas.

Este método se emplea principalmente para determinar la transparencia del agua potable, y para llevar a cabo el control del tratamiento de aguas potables, residuales y ambientales.

3.4. Polímero de estudio

El polímero con el que se va a realizar el estudio es el VKVx24. Se trata de un polímero tipo ELR que se ha obtenido mediante una fermentación alcohólica con la bacteria *Escherichia coli*, la cual ha sido modificada genéticamente en el laboratorio. El polímero posee lisinas distribuidas a lo largo de su cadena de aminoácidos (figura 7) [43]. Todos los aminoácidos que forman la cadena peptídica están en su forma L, excepto la lisina.

Su cadena de aminoácidos tiene la siguiente secuencia:

MESLLP VG VPGVG [VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG]₂₄

donde M,E, S,... representan las abreviaturas de los distintos aminoácidos (tabla 1)

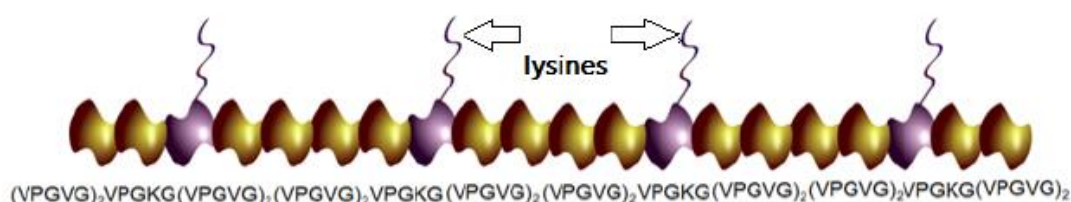


Figura 7. Imagen de la secuencia de aminoácidos del polímero VKVx24

Aminoácido	Tipo	Abreviatura	Letra	pK _{a1} (-COOH)	pK _{a2} (-NH ₂)	pK _{aR} (R)	pI
Glicina	Neutros apolares	GLI	G	2,34	9,78		6,06
Alanina		ALA	A	2,35	9,69		6,02
Valina		VAL	V	2,32	9,62		5,97
Leucina		LEU	L	2,36	9,64		6,00
Isoleucina		ILE	I	2,36	9,68		6,02
Metionina		MET	M	2,28	9,21		5,75
Prolina		PRO	P	1,99	10,60		6,30
Fenilalanina		Neutros aromáticos	PHE	F	1,83	9,29	
Tirosina	TRY		Y	2,20	9,11	10,07	5,65
Triptófano	TRP		W	2,38	9,39		5,89
Serina	Neutros polares	SER	S	2,21	9,15		5,68
Cisteína		CYS	C	1,96	10,28	8,18	5,07
Treonina		TRE	T	2,71	9,62		6,16
Asparagina		ASG	N	2,02	8,80		5,41
Glutamina		GLN	Q	2,17	9,13		5,65
Ácido aspártico	Ácidos	ASP	D	2,09	9,82	3,86	2,97
Ácido glutámico		GLU	E	2,19	9,67	4,25	3,22
Lisina	Básicos	LYS	K	2,18	8,95	10,53	9,74
Arginina		ARG	R	2,17	9,04	12,48	10,76
Histidina		HIS	H	1,82	9,17	6,00	7,58

Tabla 1. Tabla resumen de abreviaturas y datos de aminoácidos

En la cadena peptídica aparecen dos secuencias: una de iniciación, MESLLP, y otra que se va repitiendo, [VPG**K**G VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG]₂₄ que es un bloque no soluble en agua que confiere al polímero unas características especiales como son la de poseer estabilidad en un determinado rango de temperatura (termosensible), la capacidad de tener una interacción física y química con un organismo vivo sin originarle toxicidad alguna (biocompatible) y la posibilidad de entrecruzamiento entre las cadenas. Por otro lado, la secuencia VPGVG aporta al material un comportamiento semejante al de la elastina pudiendo ser sustituido el cuarto aminoácido por cualquier otro excepto por prolina, lo que aporta flexibilidad en el diseño. Esta secuencia es la responsable de las propiedades mecánicas. Mientras que la importancia de la secuencia VPG**K**G es debida a que en ella se encuentra la lisina como “residuo huésped” (**K**) que es portador de un grupo amino terminal el cual confiere la posibilidad de que se creen entrecruzamientos entre las cadenas, sensibilidad al pH del medio en el que se encuentre, además de pH básico y en condiciones fisiológicas presentar carga positiva por la participación del grupo amino.

La temperatura de transición (T_t) de este polímero y su carga neta varían con el pH del medio, a un pH inferior a 10,53 (pK_a de las lisinas) se encuentra protonado el grupo amino libre que tienen las lisinas y el extremo de la cadena de aminoácidos.

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo general de este trabajo es investigar la correlación entre la presencia de impurezas inorgánicas, sobre todo en forma de NaCl, que es la sal utilizada principalmente en el proceso de producción del polímero en estudio, VKVx24 (recombinámero tipo elastina, ELR de sus siglas en inglés) y la temperatura de transición del ELR, medida por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y turbidimetría y correlacionarla con los datos obtenidos mediante Termogravimetría (TGA) para así poder utilizar la temperatura de transición como un indicador de pureza de los ELRs.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

- Pinzas
- Espátulas
- Vidrios de reloj
- Vasos de precipitados
- Matraces aforados
- Tubos Falcon de 10 mL y de 30 mL
- Micropipetas de 2-20 μL , 20-100 μL , 50-200 μL , 200-1000 μL
- Puntas para micropipetas
- Cisoles de aluminio de 40 μL



Figura 8. Fotografía de los crisoles de aluminio

- Cisoles de alúmina de 70 μL



Figura 9. Fotografía de los crisoles de alúmina (óxido de aluminio)

- Soporte del crisol

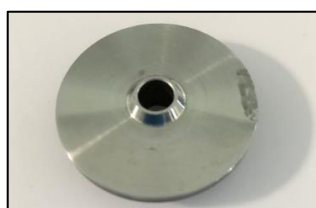


Figura 10. Fotografía del soporte del crisol

- Cierracrisoles Mettler Toledo



Figura 11. Fotografía del cierracrisoles

- Mortero
- Cubetas de plástico

5.2. Equipos

- Balanza XS105 DualRange Mettler Toledo (precisión $\pm 0,1$ mg)



Figura 12. Fotografía de la balanza analítica

- pHmetro Basic 20+ Crison



Figura 13. Fotografía del pHmetro

- TGA/SDTA851e Mettler Toledo

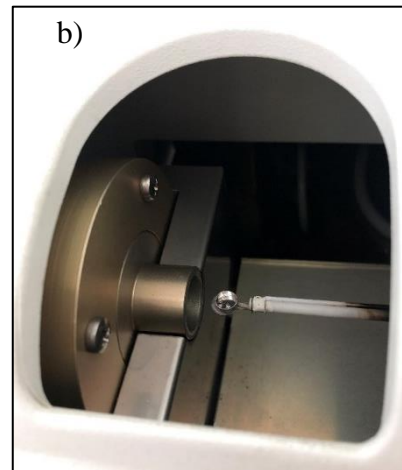


Figura 14. Fotografía del a) aparato de TGA, b) horno

- DSC882e Mettler Toledo



Figura 15. Fotografía del aparato de DSC

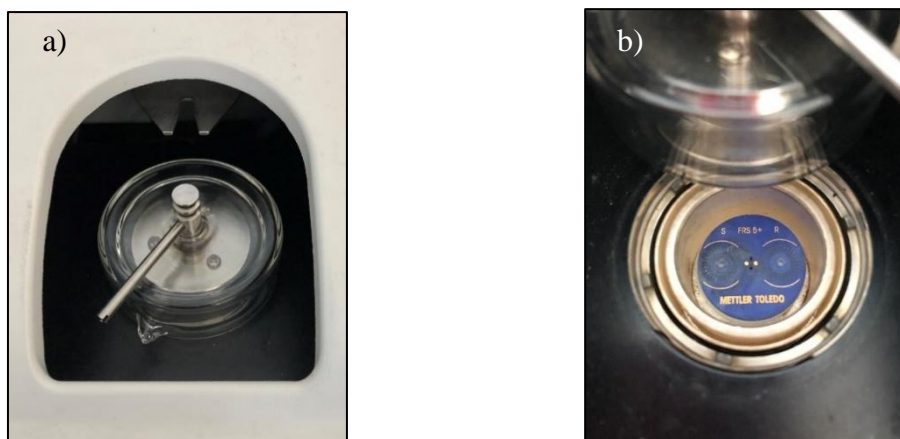


Figura 16. Fotografía del: a) horno, b) interior del horno

- Espectrofotómetro Cary 100 UV-Vis Agilent Technologies



Figura 17. Fotografía del espectrofotómetro

5.3. Compuestos

- Polímero VKVx24



Figura 18. Fotografía del polímero VKVx24

- Cloruro sódico (NaCl)
- Hidróxido sódico (NaOH)
- Agua mQ

- Discos de indio (In) para calibración



Figura 19. Fotografía de los discos de indio

5.4. Software

- METTLER STARe
- Thermal
- Word
- Excel
- SigmaPlot
- Mendeley

5.5. Métodos

5.5.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

Al someter a la muestra sólida a un programa de calentamiento a altas temperaturas, esta se descompone térmicamente, por lo que el residuo que quede en la balanza se corresponderá únicamente con las sales inorgánicas (impurezas), las cuales se van a poder cuantificar por diferencia de masa.

Se tritura en el mortero el polímero hasta que se forme una lámina y se pesan en la balanza alrededor de 5 mg, se introduce en el crisol y se coloca dicho crisol con la muestra en la balanza del TGA, previamente tarada con el crisol vacío. De este modo el valor de la masa que aparece en la pantalla del TGA se corresponde únicamente con la muestra. Se selecciona en el software (METTLER STARe) el método que se va a utilizar, en este caso: se calienta el horno de 50°C a 900°C, con una velocidad de calentamiento de 30°C/min y flujo de N₂ de 60 mL/min.

Se mide la muestra por triplicado.

Calibración del TGA:

Para realizar la calibración se utiliza una sustancia patrón estable cuya temperatura y calor de fusión son conocidos. Normalmente se utilizan sustancias metálicas (indio y aluminio) debido a su buena conductividad térmica. El equipo utilizado (TGA/SDTA) realiza de forma simultánea las dos mediciones. El TGA determina la variación de peso en función de la temperatura o del tiempo y el SDTA determina de forma cualitativa el calor que se ha absorbido o desprendido en la fusión. La señal SDTA se puede transformar en señal DSC mediante una calibración. Para que la calibración sea válida en un amplio intervalo de temperatura es necesario utilizar distintas sustancias patrón (indio y aluminio).

Para comprobar si la calibración se ha realizado correctamente se repite el proceso y si los resultados obtenidos son similares a los de la calibración se considera el proceso como válido. En nuestro caso para realizar la calibración se utiliza el método In/Al. En un crisol de alúmina de 70 μ L se coloca una porción de 2-10 mg de aluminio y de 10-20 mg de indio sin que ambos elementos estén en contacto para evitar que al fundirse se forme una amalgama.



Figura 20. Fotografía del crisol para la calibración del TGA

5.5.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Preparación de las disoluciones:

La muestra va a estar compuesta por el polímero y la impureza NaCl de cantidad conocida que se va a añadir.

Se preparan distintas disoluciones mezclando diferentes proporciones del polímero y de NaCl. La concentración de la muestra total (polímero + sal) a medir en el DSC debe ser de 50 mg/mL y el volumen de 20 μ L. Se añade una cantidad de NaCl comprendida entre un 0,5% y un 10% de la cantidad de muestra total, es decir, entre 0,25 mg/mL y 5 mg/mL.

% polímero	% NaCl	C polímero (mg/mL)	C NaCl (mg/mL)
99,5	0,5	49,75	0,25
98	2	49,00	1,00
95	5	47,50	2,50
93	7	46,50	3,50
90	10	45,00	5,00

Tabla 2. Proporciones de polímero y NaCl en las disoluciones para DSC

Primero se preparan disoluciones independientes en agua: una de NaCl y otra del polímero, la primera del orden de 10 mg/mL y la segunda del orden de 100 mg/mL.

A partir de estas dos disoluciones, se preparan disoluciones de 2 mL de polímero+NaCl añadiendo los volúmenes que se detallan en la siguiente tabla. Con una micropipeta se pipetea los volúmenes correspondientes de cada disolución y se añaden a un tubo Falcon de 10 mL, enrasando a 2 mL con agua mQ.

% polímero	% NaCl	V polímero (mL)	V NaCl (mL)
99,5	0,5	1,00	0,05
98	2	0,98	0,20
95	5	0,95	0,50
93	7	0,93	0,70
90	10	0,90	1,00

Tabla 3. Volúmenes de polímero y NaCl a añadir en las disoluciones para DSC

Los cálculos se realizan con la expresión: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

Las disoluciones que contienen polímero, es decir, tanto la disolución únicamente de polímero como las de polímero+NaCl, tienen que conservarse en frigorífico a temperatura de unos 4°C ya que a mayores temperaturas el polímero puede transicionar.

También se prepara una disolución de 50 mg/mL de polímero de otro lote de producción aleatorio (sin añadir NaCl), a efectos del control de la pureza para comprobar la viabilidad del método.

Todas las disoluciones deben tener un pH alrededor de 12 debido a las características ácido-base de las lisinas.

Análisis en el DSC:

Se realiza la medición de cada una de las 5 disoluciones de polímero+NaCl para obtener la temperatura de transición de cada una de ellas y así realizar una línea de calibrado en la que se correlacione la cantidad de sal añadida con la temperatura de transición. Para ello se pesa en la balanza del orden de $20 \pm 0,1$ mg de la disolución correspondiente en un crisol de aluminio de 40 μ L. La muestra se debe tomar con micropipetas cuyas puntas se encuentren a la misma temperatura de la muestra para evitar que el polímero transicione. A continuación, se cierra el crisol con la tapa con ayuda del cierracrisoles. Para la referencia se realiza el mismo procedimiento, pero utilizando agua mQ. Se colocan en el horno del DSC ambos crisoles (muestra y referencia) y se selecciona en el software del ordenador (METTLER STARe) el método a utilizar, que es el siguiente: se mantiene el horno a 0°C durante 5 min, posteriormente se va aumentando la temperatura de 0°C a 50°C con una velocidad de calentamiento de 5°C/min y un flujo de N₂ de 5 mL/min utilizado como gas inerte para enfriar.

Se mide cada disolución por triplicado.

A continuación, se mide mediante el mismo procedimiento la disolución de 50 mg/mL correspondiente a un polímero del otro lote de producción aleatorio mencionado anteriormente.

5.5.3. Turbidimetría

Se somete a la muestra a un programa de calentamiento, por lo que el polímero al transicionar aporta turbidez, es decir, aumenta la absorbancia y disminuye la transmitancia.

Preparación de las disoluciones:

La muestra va a estar compuesta por el polímero y la impureza NaCl de cantidad conocida que se va a añadir.

Se preparan distintas disoluciones mezclando en diferentes proporciones el polímero y NaCl. La concentración de la muestra total (polímero + sal) a medir en el espectrofotómetro debe ser de 25 mg/mL y el volumen de 2 mL. Se añade una cantidad de NaCl comprendida entre un 0,5% y un 10% de la cantidad de muestra total.

% polímero	% NaCl	C polímero (mg/mL)	C NaCl (mg/mL)
99,5	0,5	24,875	0,125
98	2	24,500	0,500
95	5	23,750	1,250
93	7	23,250	1,750
90	10	22,500	2,500

Tabla 4. Proporciones de polímero y NaCl en las disoluciones para turbidimetría

Primero se preparan disoluciones independientes en agua: una de NaCl y otra del polímero, la primera del orden de 5 mg/mL y la segunda del orden de 50 mg/mL.

A partir de estas dos disoluciones, se preparan disoluciones de 10 mL de polímero+NaCl añadiendo los volúmenes que se detallan en la siguiente tabla. Con una micropipeta se pipetea los volúmenes correspondientes de cada disolución y se añaden a un tubo Falcon, enrasando a 10 mL con agua mQ.

% polímero	% NaCl	V polímero (mL)	V NaCl (mL)
99,5	0,5	5,00	0,25
98	2	4,92	1,00
95	5	4,77	2,50
93	7	4,67	3,50
90	10	4,52	5,00

Tabla 5. Volúmenes de polímero y NaCl a añadir en las disoluciones para turbidimetría

Los cálculos se realizan con la expresión: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

Las disoluciones que contienen polímero, es decir, tanto la disolución únicamente de polímero como las de polímero+NaCl, tienen que conservarse refrigeradas a 4°C ya que a mayores temperaturas el polímero puede transicionar.

También se prepara una disolución de 25 mg/mL de polímero de otro lote de producción aleatorio (sin añadir NaCl), a efectos del control de la pureza para comprobar la viabilidad del método.

Como lo indicado en el apartado anterior, todas las disoluciones deben tener un pH alrededor de 12 debido a las características ácido-base de las lisinas.

Análisis por espectrofotometría de absorción molecular:

Se realiza la medición de cada una de las 5 disoluciones de polímero+NaCl para obtener la temperatura de transición de cada una de ellas y así realizar una línea de calibrado en la que poder correlacionar la cantidad de sal añadida con la temperatura de transición. Para ello se introducen en las cubetas de plástico alrededor de 2 mL de cada una de las disoluciones, reservando una cubeta para el blanco (2 mL de agua mQ). Se mide la radiación transmitida a 350 nm calentando de 6°C a 60°C, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. Mediante el software Thermal se registran los datos obtenidos.

Se mide cada disolución por quintuplicado.

A continuación, se mide mediante el mismo procedimiento la disolución de 25 mg/mL correspondiente a un polímero del otro lote de producción aleatorio mencionado anteriormente.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

Para cada uno de los análisis se obtiene un termograma de este tipo:

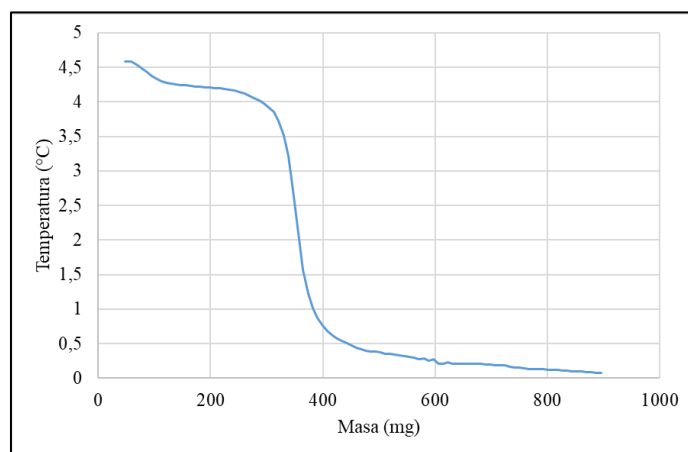


Figura 21. Gráfica del análisis 1 para TGA (termograma)

Con ayuda del software (METTLER STARe) se calcula el porcentaje de pérdida de masa y la cantidad de masa perdida:

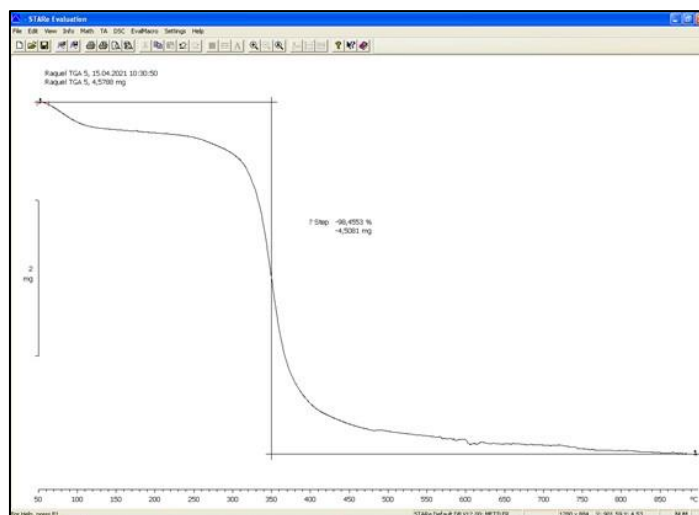


Figura 22. Gráfica del análisis 1 para TGA con el cálculo de pérdida de masa (termograma)

Todos los demás gráficos obtenidos aparecen recogidos en el anexo.

Dichos valores aparecen recogidos en la siguiente tabla:

Análisis	masa inicial (mg)	pérdida masa (mg)	masa que queda (mg)	% pérdida masa	% impurezas inorgánicas
1	4,57	-4,50	0,07	-98,26	1,74
2	4,75	-4,74	0,01	-99,83	0,17
3	4,81	-4,75	0,06	-98,77	1,23

Tabla 6. Valores obtenidos en los análisis de la muestra para TGA

promedio pérdida masa (mg)	-4,66
promedio masa que queda (mg)	0,05
promedio % pérdida masa	-98,95
promedio % impurezas inorgánicas	1,05

Tabla 7. Promedio de los valores obtenidos en los análisis de la muestra para TGA

6.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En la siguiente tabla aparecen recogidas las masas pesadas de cada una de las disoluciones en las tres repeticiones realizadas con cada una de ellas.

% polímero	% NaCl	Muestra	Repetición	masa muestra (mg)	masa referencia (mg)
99,5	0,5	1	1	20,0	19,9
		1	2	20,2	19,9
		1	3	19,8	19,9
98	2	2	1	20,3	20,2
		2	2	20,2	19,8
		2	3	20,0	19,8
95	5	3	1	20,1	19,8
		3	2	19,8	19,8
		3	3	19,8	19,8
93	7	4	1	19,8	19,8
		4	2	19,8	19,8
		4	3	19,8	19,8
90	10	5	1	20,4	20,0
		5	2	20,3	20,0
		5	3	20,0	20,0

Tabla 8. Valores de las masas pesadas de cada una de las disoluciones a analizar por DSC

Al finalizar cada uno de los análisis se obtiene un gráfico de este tipo:

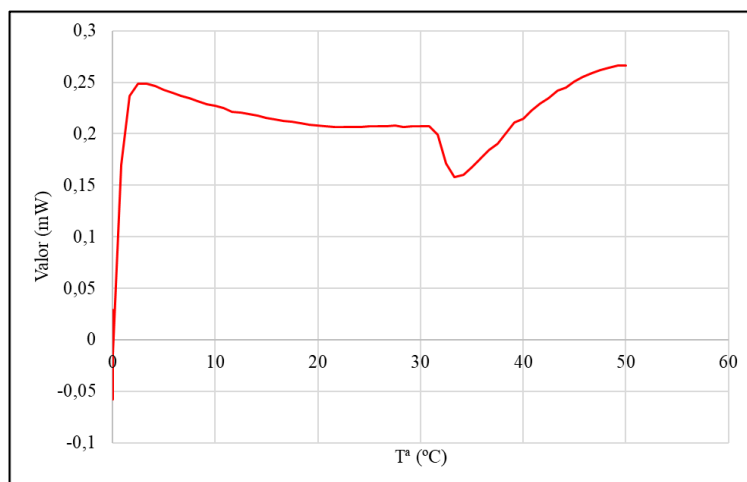


Figura 23. Gráfica DSC de la muestra 1, repetición 1

Todos los demás gráficos obtenidos aparecen recogidos en el anexo.

Con ayuda del software (METTLER STARE) se integra el pico obtenido, consiguiendo el valor de la temperatura del mínimo de dicho pico, que se corresponde con la temperatura de transición.

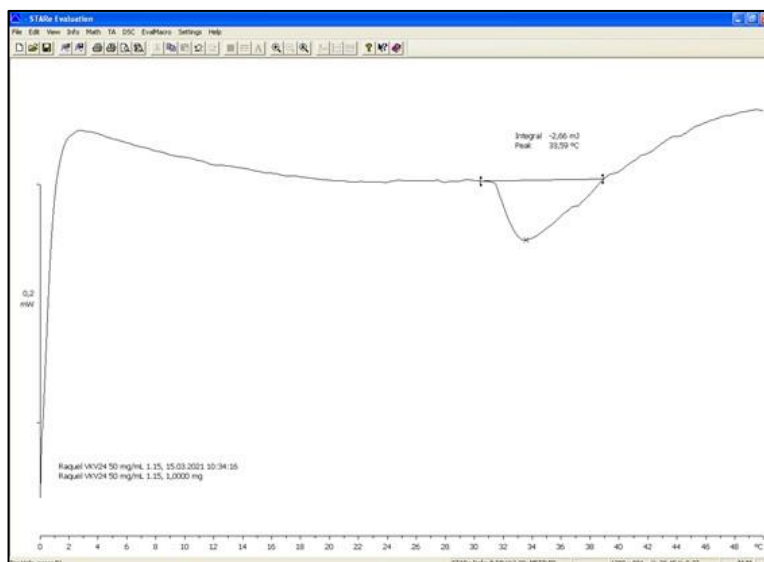


Figura 24. Gráfica DSC de la muestra 1, repetición 1 con el pico integrado

Todas las demás integrales calculadas aparecen recogidas en el anexo.

En la siguiente tabla aparecen recogidas todas las temperaturas de transición de cada uno de los análisis y el promedio de la temperatura de cada una de las disoluciones, calculando la desviación estándar de cada una de las temperaturas promedio.

% polímero	% NaCl	Muestra	Repetición	T _t (°C)	T ^a media (°C)	Desv. Est.
99,5	0,5	1	1	33,59	33,98	± 0,35
		1	2	34,27		
		1	3	34,07		
98	2	2	1	33,34	33,56	± 0,19
		2	2	33,67		
		2	3	33,67		
95	5	3	1	32,74	32,88	± 0,12
		3	2	32,92		
		3	3	32,97		
93	7	4	1	32,41	32,52	± 0,10
		4	2	32,61		
		4	3	32,54		
90	10	5	1	31,74	31,66	± 0,08
		5	2	31,58		
		5	3	31,67		

Tabla 9. Valores de las temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por DSC

Los análisis de la disolución de polímero de otro lote de producción (sin añadir NaCl) proporcionan las siguientes temperaturas de transición:

Análisis	T _t (°C)
1	31,02
2	31,22
3	31,05
T^a media (°C)	31,10
Desv. Est.	0,11

Tabla 10. Valores de la temperatura de transición de la disolución de polímero para DSC

6.3. Turbidimetría

Al finalizar cada uno de los análisis se obtiene un gráfico de este tipo:

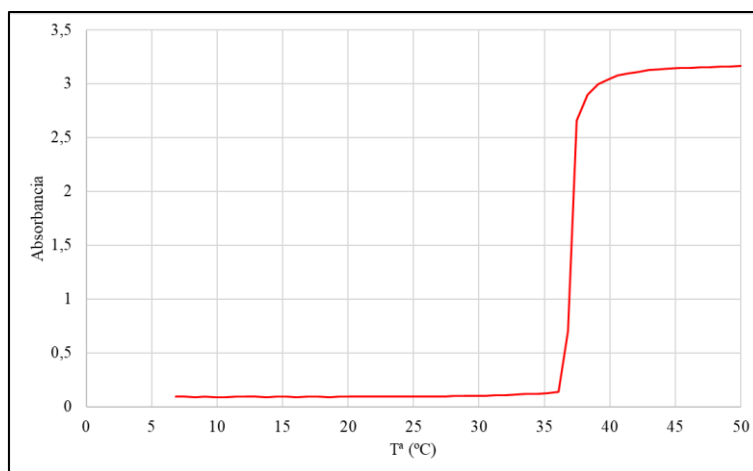


Figura 25. Gráfica de la muestra 1, repetición 1 para turbidimetría

Todos los demás gráficos obtenidos aparecen recogidos en el anexo.

En base a los datos reflejados en la anterior figura, se realiza la primera derivada para obtener de forma más concluyente la temperatura donde la pendiente adquiere valor máximo, la cual se corresponde con la temperatura de transición.

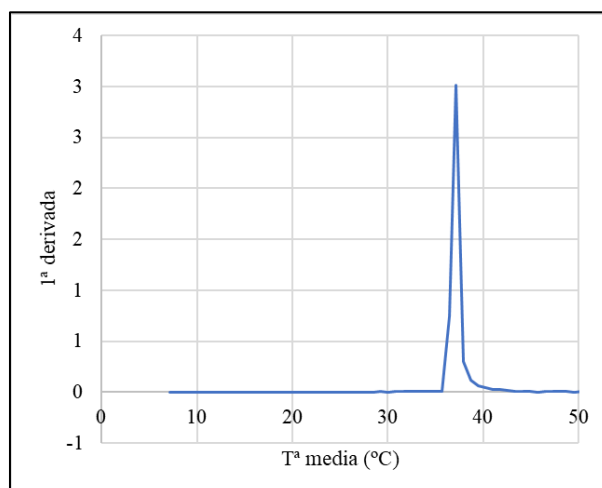


Figura 26. Gráfica de la primera derivada de la muestra 1, repetición 1 para turbidimetría

En la siguiente tabla aparecen recogidas las temperaturas de transición de cada uno de los análisis y el promedio de la temperatura de cada una de las disoluciones, calculando la desviación estándar de cada una de las temperaturas promedio.

% polímero	% NaCl	Muestra	Repetición	T ^a transición	T ^a media (°C)	Desv. Est.
99,5	0,5	1	1	37,15	37,07	± 0,27
		1	2	37,24		
		1	3	37,37		
		1	4	36,76		
		1	5	36,82		
98	2	2	1	36,67	36,78	± 0,14
		2	2	36,73		
		2	3	36,88		
		2	4	36,97		
		2	5	36,65		
95	5	3	1	36,32	36,24	± 0,19
		3	2	36,27		
		3	3	36,26		
		3	4	36,42		
		3	5	35,92		
93	7	4	1	35,34	35,88	± 0,39
		4	2	35,77		
		4	3	35,84		
		4	4	36,07		
		4	5	36,40		
90	10	5	1	35,17	35,38	± 0,17
		5	2	35,29		
		5	3	35,36		
		5	4	35,49		
		5	5	35,59		

Tabla 11. Valores de las temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por turbidimetría

Los análisis de la disolución de polímero de otro lote de producción (sin añadir NaCl) proporcionan los siguientes resultados:

ANÁLISIS	T_t (°C)
1	35,32
2	35,42
3	35,62
4	35,69
5	35,82
T^a media (°C)	35,57
Desv. Est.	0,20

Tabla 12. Valores de la temperatura de transición de la disolución de polímero para turbidimetría

7. DISCUSIÓN

Uno de los factores que más puede afectar a la temperatura de transición de los ELRs es la presencia de sales inorgánicas y cuanto mayor sea la cantidad de ellas, menor será la temperatura de transición. Este comportamiento se puede observar en los resultados obtenidos en los análisis y cómo está relacionado con la pureza del polímero. Esto ocurre tanto en DSC como en turbidimetría, aunque cada uno mide procesos distintos, mientras que en el primero es un proceso energético, en el segundo es físico, de dispersión de la luz.

A través de un análisis termogravimétrico, y de forma directa, se determina la pureza del ELR referencia para posteriormente obtener las líneas de calibrado del DSC y de la turbidimetría. Como se puede observar en el termograma, se produce una pérdida de masa hasta que en la balanza solo quedan las sales inorgánicas, lo que concuerda con polímeros proteicos que no sufren cambios en la estructura al calentarlos, como puede ocurrir con los termoplásticos. El polímero comienza a descomponerse a unos 300°C, como se puede observar en las figuras 21 y 22. El primer salto que se aprecia en el termograma se corresponde con la pérdida de humedad del polímero. A través de la tabla 7 se puede observar que el polímero tiene una pérdida de masa media de un 98,95%, valor de la pureza del polímero, y el resto, un 1,05%, se corresponde con el valor medio de las impurezas inorgánicas. La pureza del polímero también se puede obtener de forma indirecta con el DSC y la turbidimetría a través de la medición de la temperatura de transición de la disolución que contiene únicamente polímero e interpolando en las líneas de calibrado de cada uno de los métodos, respectivamente.

Al representar las temperaturas de transición obtenidas en el DSC y en la turbidimetría para cada una de las disoluciones de polímero + NaCl frente al porcentaje de polímero añadido (pureza del polímero) (figuras 27 y 28) para se observa que cuanto mayor es la pureza del polímero mayor es la temperatura de transición, o lo que es lo mismo, cuanto mayor cantidad de impurezas inorgánicas, menor es la temperatura de transición.

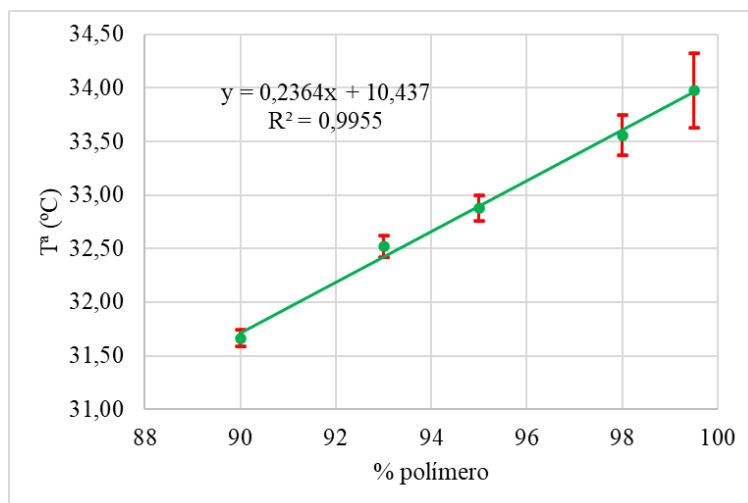


Figura 27. Línea de calibrado para DSC

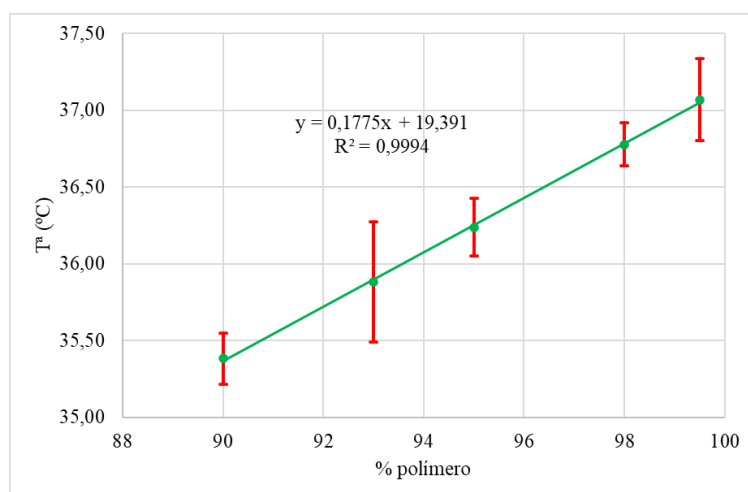


Figura 28. Línea de calibrado para turbidimetría

Al comparar las representaciones anteriores se observa que a igual proporción de los solutos, cuanto mayor es la concentración final de la disolución de trabajo (DSC 50 mg/mL, turbidimetría 25 mg/mL) las temperaturas de transición son más bajas. Esto es debido a que al aumentar la temperatura el ELR forma puentes de H entre sus cadenas y tiene un comportamiento hidrofóbico. Al haber menos proporción de agua, es decir, disolución más concentrada en polímero, la temperatura de transición es más baja porque este alcanza más rápido el comportamiento hidrofóbico. Y por el contrario, al haber más proporción de agua, es decir, disolución más diluída, la temperatura de transición es más alta manteniéndose el ELR en conformación extendida a temperaturas más altas.

Las líneas de calibrado también se pueden utilizar para conocer por extrapolación cuál sería la temperatura de transición del ELR referencia si tuviese un 100% de pureza. Extrapolando en las líneas de calibrado de las figuras 27 y 28 se obtienen unas temperaturas de transición del polímero de 34,08°C y 37,14°C para DSC y turbidimetría, respectivamente. Además se pueden interpolar en dichas líneas de calibrado otros lotes del mismo ELR y obtener un método de control de la pureza de esos nuevos lotes. En este trabajo se analizó otra muestra del mismo polímero perteneciente a otro lote de producción. Interpolando en las líneas de calibrado de las figuras 27 y 28 y con los datos de las tablas 10 y 12, se obtiene una pureza de un 87,39% para DSC y 91,18% para turbidimetría. Con esto se detecta que el lote analizado es de menor pureza que la muestra utilizada para las líneas de calibrado. Volviendo a lavar el polímero se puede retirar la mayor cantidad posible de impurezas inorgánicas y de este modo conseguir un mayor grado de pureza. Se puede saber la pureza de un lote solo por un análisis de DSC o turbidimetría, métodos mucho más rápidos que el TGA y sobre todo no destructivos, pudiéndose recuperar la muestra al final del análisis si fuera necesario. Utilizando estos dos métodos se puede abarcar el rango de concentraciones que se suele utilizar para aplicaciones biomédicas y así conocer el comportamiento térmico que van a tener los ELRs dependiendo de la concentración. En ingeniería de tejidos se fabrican hidrogeles de 50 mg/mL mientras que para dosificación de fármacos y nanopartículas se trabaja a menores concentraciones (del orden de 12 mg/mL).

Otra de las consecuencias del estudio realizado es que conociendo la influencia de las sales en la temperatura de transición del ELR, esta se puede modular aumentando o disminuyendo la cantidad de sales para ajustar la temperatura de transición a la temperatura deseada. Así se puede jugar con el diseño y producción de materiales inteligentes que pueden cambiar su comportamiento dependiendo de la temperatura o la concentración de sales para ser utilizados en ingeniería de tejidos, dosificación de fármacos, formación de nanopartículas que contengan medicamentos en su interior y que al inyectarlas en el ser humano a la temperatura corporal normal sean estables, pero cuando se produce un aumento de la temperatura corporal debido a la fiebre, se alcance la temperatura de transición del polímero, se rompa dicha nanopartícula y se libere el medicamento deseado para bajar la fiebre.

8. CONCLUSIONES

Mediante el análisis termogravimétrico (TGA) se han podido cuantificar directamente, aunque de manera destructiva las impurezas inorgánicas del polímero de referencia.

Por técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y turbidimetría, mediante línea de calibrado en intervalo de concentraciones entre 0,5% y 10% de NaCl, se ha llevado a cabo la cuantificación de dicha sal en el polímero, en este caso por técnicas no destructivas.

Los procedimientos desarrollados permitirían detectar posibles anomalías durante el proceso de producción del compuesto pudiéndose llevar a cabo, en su caso, las rectificaciones oportunas, o bien, variar las características del producto por adición de sales inorgánicas durante el proceso de fabricación del mismo, que permitieran obtener otros compuestos de características específicas en su aplicación.

Como conclusión final, por primera vez se ha realizado sobre el compuesto VKVx24 la determinación de impurezas inorgánicas mediante las técnicas anteriormente descritas (TGA, DSC y turbidimetría).

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. M. Macarulla, J.M.; Goñi, *Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural - Dialnet.* .
- [2] R. Chandra and R. Rustgi, “Biodegradable polymers,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 23, no. 7, pp. 1273–1335, 1998, doi: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7.
- [3] J. Coreño-Alonso and M. T. Méndez-Bautista, “Relationship between structure and properties of polymers,” *Educ. Quim.*, vol. 21, no. 4, pp. 291–299, Oct. 2010, doi: 10.1016/s0187-893x(18)30098-3.
- [4] S. M. Mithieux and A. S. Weiss, “Elastin,” *Adv. Protein Chem.*, vol. 70, pp. 437–461, Jan. 2005, doi: 10.1016/S0065-3233(05)70013-9.
- [5] C. Tickle, “Matriz extracelular animal.”
- [6] D. Parry and J. Squire, “Advances in Protein Chemistry,” *Adv. Protein Chem.*, vol. 70, 2005, doi: 10.1016/S0065-3233(05)70015-2.
- [7] J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, M. Alonso, F. J. Arias, and A. M. Testera, “‘Recombinamers’ as advanced materials for the post-oil age,” *Polymer (Guildf)*., vol. 50, no. 22, pp. 5159–5169, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.08.032.
- [8] “Progress in Polymer Science,” vol. 30, no. 11, pp. iii–iii, Nov. 2005, doi: 10.1016/s0079-6700(05)00123-1.
- [9] Urry DW., *What Sustains Life? - Consilient Mechanisms for Protein-Based Machines and Materials*. Birkhäuser Boston, 2007.
- [10] C. García-Arévalo, A. Girotti, F. J. Arias, S. Martín, I. M. López, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Obtención de un polímero de tipo Elastina modificado con secuencias Bioactivas y Biodegradables, para su aplicación en ingeniería,” *Biomecánica*, vol. 17, no. 1, Jun. 2009, doi: 10.5821/sibb.v17i1.1786.
- [11] A. Fernández-Colino, A. Girotti, M. I. López, F. J. Arias, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas,” *Biomecánica*, vol. 19, no. 1, Dec. 2011, doi: 10.5821/sibb.v19i1.1811.
- [12] H. Betre, W. Liu, M. R. Zalutsky, A. Chilkoti, V. B. Kraus, and L. A. Setton, “A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 115, no. 2, pp. 175–182, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.07.022.
- [13] S. M. Mithieux, J. E. J. Rasko, and A. S. Weiss, “Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 20, pp. 4921–4927, Sep. 2004, doi:

- 10.1016/j.biomaterials.2004.01.055.
- [14] R. E. Sallach *et al.*, “Long-term biostability of self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 4, pp. 779–791, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.082.
- [15] F. W. Keeley, C. M. Bellingham, and K. A. Woodhouse, “Elastin as a self-organizing biomaterial: Use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 357, no. 1418, pp. 185–189, Feb. 2002, doi: 10.1098/rstb.2001.1027.
- [16] D. W. Urry, T. L. Trapane, and K. U. Prasad, “Phase-structure transitions of the elastin polypentapeptide–water system within the framework of composition–temperature studies,” *Biopolymers*, vol. 24, no. 12, pp. 2345–2356, 1985, doi: 10.1002/bip.360241212.
- [17] J. Uitto, “Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 72, no. 1, pp. 1–10, 1979, doi: 10.1111/1523-1747.ep12530093.
- [18] J. Uitto, “Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 72, no. 1, pp. 1–10, 1979, doi: 10.1111/1523-1747.ep12530093.
- [19] J. C. Rodríguez-Cabello, A. Girotti, A. Ribeiro, and F. J. Arias, “Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 811, pp. 17–38, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-388-2_2.
- [20] R. E. Sallach, W. Cui, J. Wen, A. Martinez, V. P. Conticello, and E. L. Chaikof, “Elastin-mimetic protein polymers capable of physical and chemical crosslinking,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 3, pp. 409–422, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.040.
- [21] J. Despanie, J. P. Dhandhukia, S. F. Hamm-Alvarez, and J. A. MacKay, “Elastin-like polypeptides: Therapeutic applications for an emerging class of nanomedicines,” *J. Control. Release*, vol. 240, pp. 93–108, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.010.
- [22] J. Reguera, A. Fahmi, P. Moriarty, A. Girotti, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymer [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 41, pp. 13212–13213, Oct. 2004, doi: 10.1021/ja047417f.
- [23] A. Ribeiro, F. J. Arias, J. Reguera, M. Alonso, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Influence

- of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers,” *Biophys. J.*, vol. 97, no. 1, pp. 312–320, 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2009.03.030.
- [24] D. W. Urry, “Molecular Machines: How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical Changes,” *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 32, no. 6, pp. 819–841, Jun. 1993, doi: 10.1002/anie.199308191.
- [25] J. Reguera, D. W. Urry, T. M. Parker, D. T. McPherson, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Effect of NaCl on the exothermic and endothermic components of the inverse temperature transition of a model elastin-like polymer,” *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 2, pp. 354–358, Feb. 2007, doi: 10.1021/bm060936l.
- [26] A. Girotti, A. Fernández-Colino, I. M. López, J. C. Rodríguez-Cabello, and F. J. Arias, “Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications,” *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 10, pp. 1174–1186, Oct. 2011, doi: 10.1002/biot.201100116.
- [27] J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martn, A. Girotti, C. Garca-Arévalo, F. J. Arias, and M. Alonso, “Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers,” *Nanomedicine*, vol. 6, no. 1, pp. 111–122, Jan. 2011, doi: 10.2217/nmm.10.141.
- [28] S. R. MacEwan and A. Chilkoti, “Elastin-like polypeptides: biomedical applications of tunable biopolymers,” *Biopolymers*, vol. 94, no. 1, pp. 60–77, 2010, doi: 10.1002/bip.21327.
- [29] J. C. Rodríguez-Cabello, M. Pierna, A. Fernández-Colino, C. García-Arévalo, and F. J. Arias, “Recombinamers: Combining molecular complexity with diverse bioactivities for advanced biomedical and biotechnological applications,” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 125, pp. 145–179, 2011, doi: 10.1007/10_2010_94.
- [30] A. Altunbas and D. J. Pochan, “Peptide-based and polypeptide-based hydrogels for drug delivery and tissue engineering,” *Top. Curr. Chem.*, vol. 310, pp. 135–167, 2012, doi: 10.1007/128_2011_206.
- [31] D. E. Meyer and A. Chilkoti, “Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, no. 11, pp. 1112–1115, Nov. 1999, doi: 10.1038/15100.
- [32] T. Shinoka *et al.*, “Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 115, no. 3, pp. 536–546, Mar. 1998, doi: 10.1016/S0022-5223(98)70315-0.
- [33] F. Opitz *et al.*, “Tissue engineering of ovine aortic blood vessel substitutes using

- applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 32, no. 2, pp. 212–222, Feb. 2004, doi: 10.1023/B:ABME.0000012741.85600.f1.
- [34] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, and P. V. Hatton, “An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 3, pp. 3640–3659, Feb. 2014, doi: 10.3390/ijms15033640.
- [35] S. R. Macewan and A. Chilkoti, “Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 314–330, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.028.
- [36] I. Ul Ahad *et al.*, “Surface modification of polymers for biocompatibility via exposure to extreme ultraviolet radiation,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 9, pp. 3298–3310, 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34958.
- [37] U. P. de Madrid, “Métodos de análisis térmico.” pp. 1–32, 2010.
- [38] D. Skoog, F. Holler, and S. Crouch, *Principios de análisis fundamental*. 2008.
- [39] “Técnicas - Análisis Térmico - Caracterización de Materiales Cristalinos.” <http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/AT.htm> (accessed Jun. 26, 2021).
- [40] E. Rodríguez and E. Villegas, “Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico,” *Métodos y Mater.*, vol. 2, no. 1, pp. 25–32, 1969, doi: 10.15517/mym.v2i1.13470.
- [41] “Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) – guíalab.” <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/calorimetria-diferencial-de-barrido-dsc/> (accessed Jun. 26, 2021).
- [42] A. Antony and J. Mitra, “Refractive index-assisted UV/Vis spectrophotometry to overcome spectral interference by impurities,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1149, p. 238186, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.12.061.
- [43] G. P. Andrews, T. P. Laverty, and D. S. Jones, “Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 3, pp. 505–518, 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.09.028.

10. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

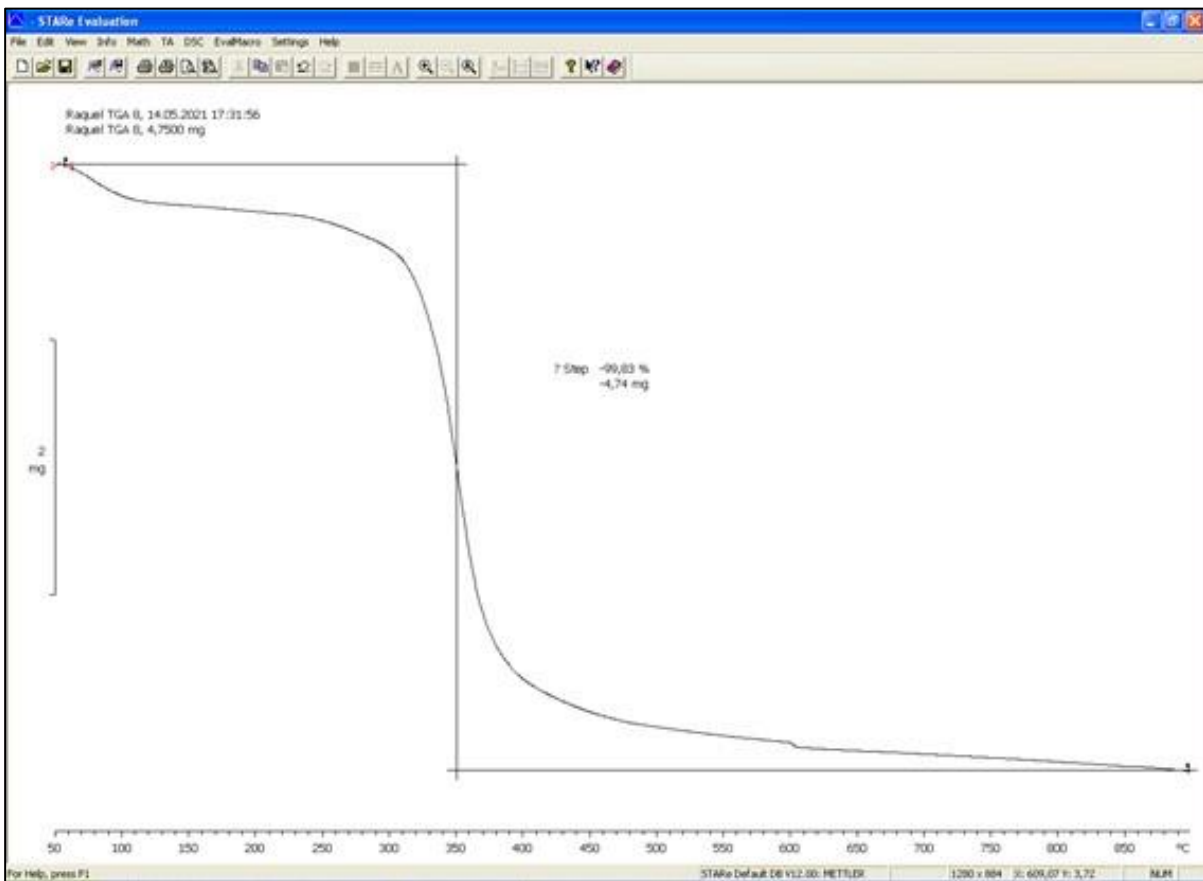
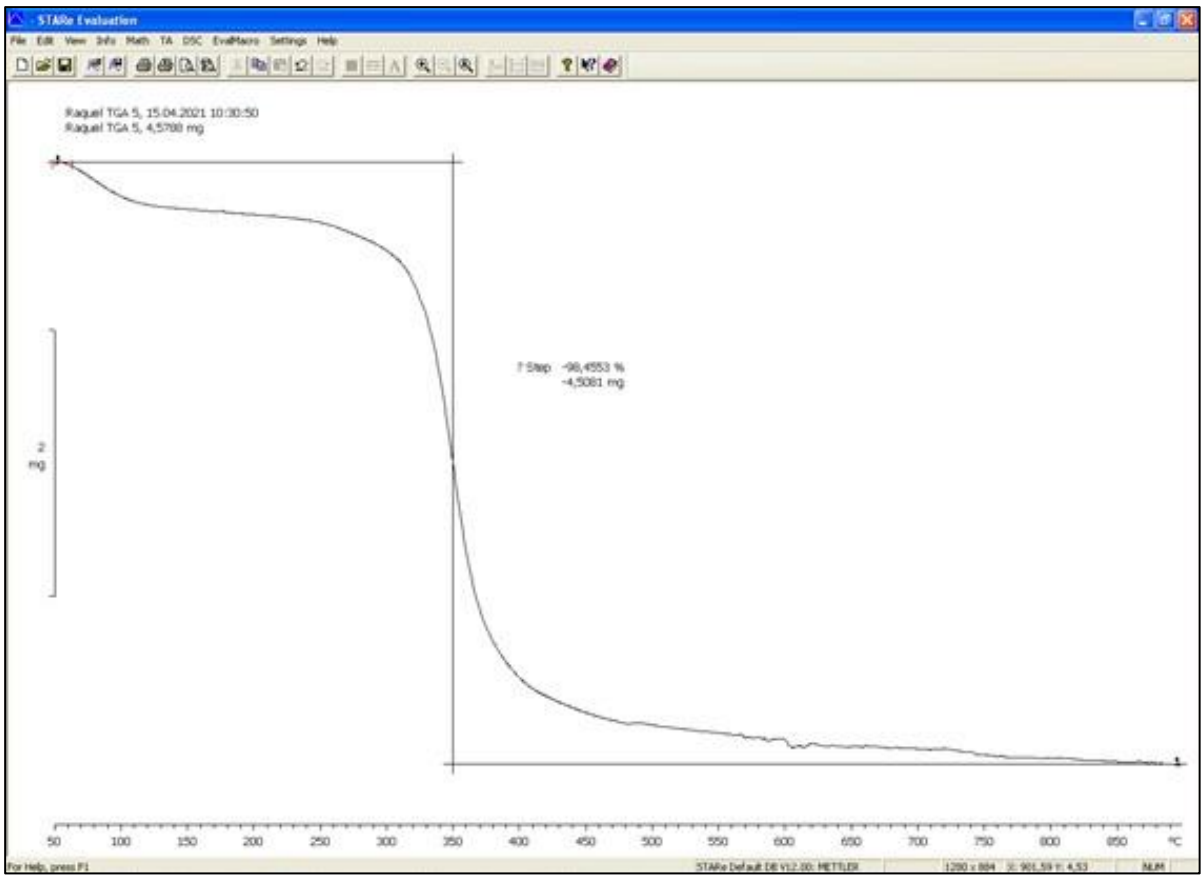
TABLAS

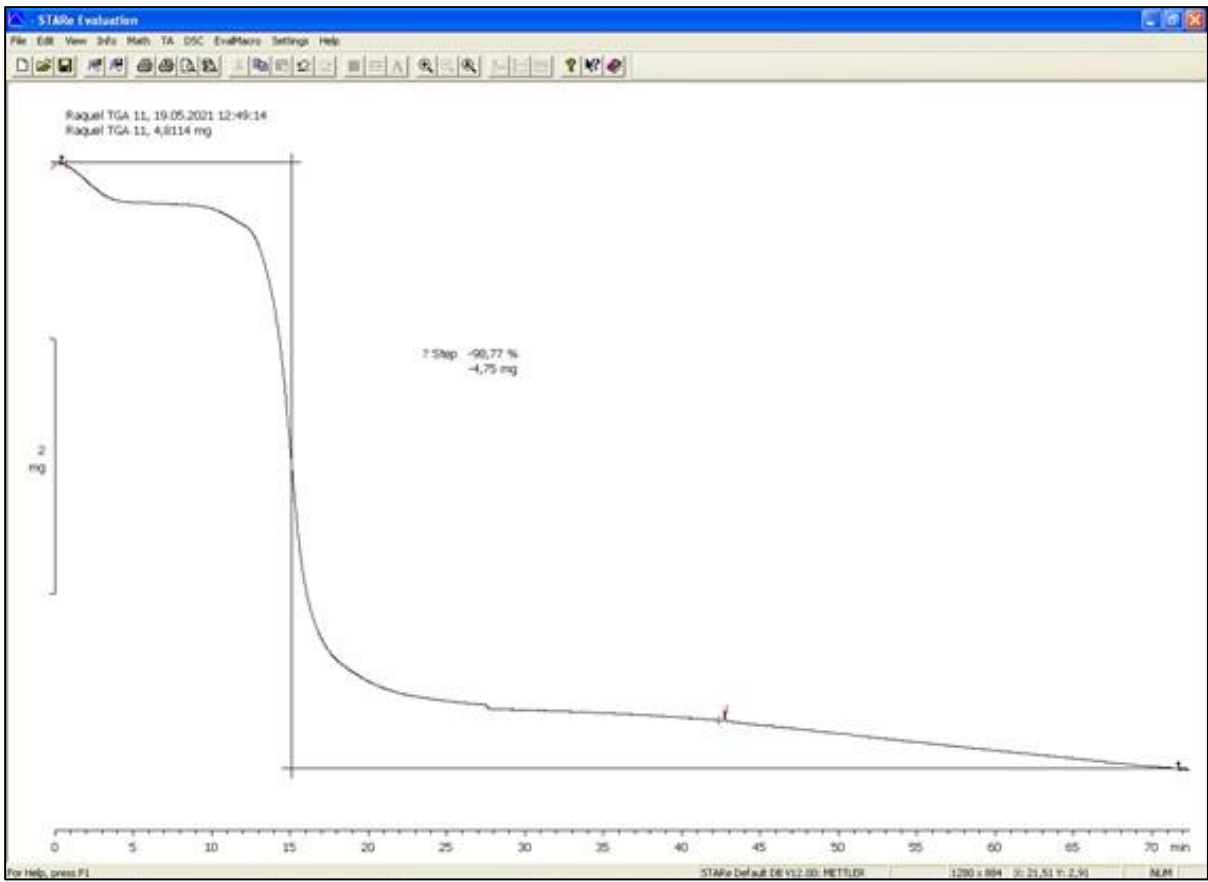
- Tabla 1.** Tabla resumen de abreviaturas y datos de aminoácidos
- Tabla 2.** Proporciones de polímero y NaCl en las disoluciones para DSC
- Tabla 3.** Volúmenes de polímero y NaCl a añadir en las disoluciones para DSC
- Tabla 4.** Proporciones de polímero y NaCl en las disoluciones para turbidimetría
- Tabla 5.** Volúmenes de polímero y NaCl a añadir en las disoluciones para turbidimetría
- Tabla 6.** Valores obtenidos en los análisis de la muestra para TGA
- Tabla 7.** Promedio de los valores obtenidos en los análisis de la muestra para TGA
- Tabla 8.** Valores de las masas pesadas de cada una de las disoluciones a analizar por DSC
- Tabla 9.** Valores de las temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por DSC
- Tabla 10.** Valores de la temperatura de transición de la disolución de polímero para DSC
- Tabla 11.** Valores de las temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por turbidimetría
- Tabla 12.** Valores de la temperatura de transición de la disolución de polímero para turbidimetría

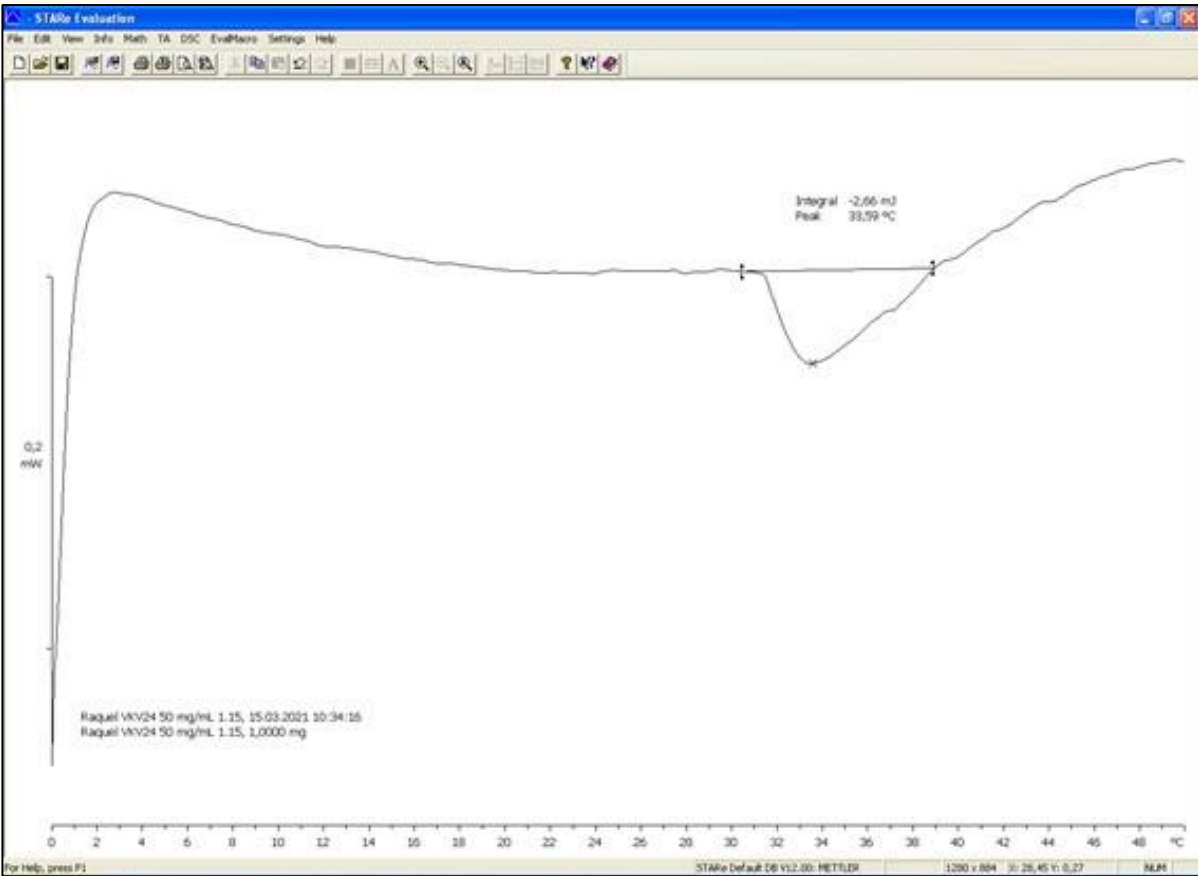
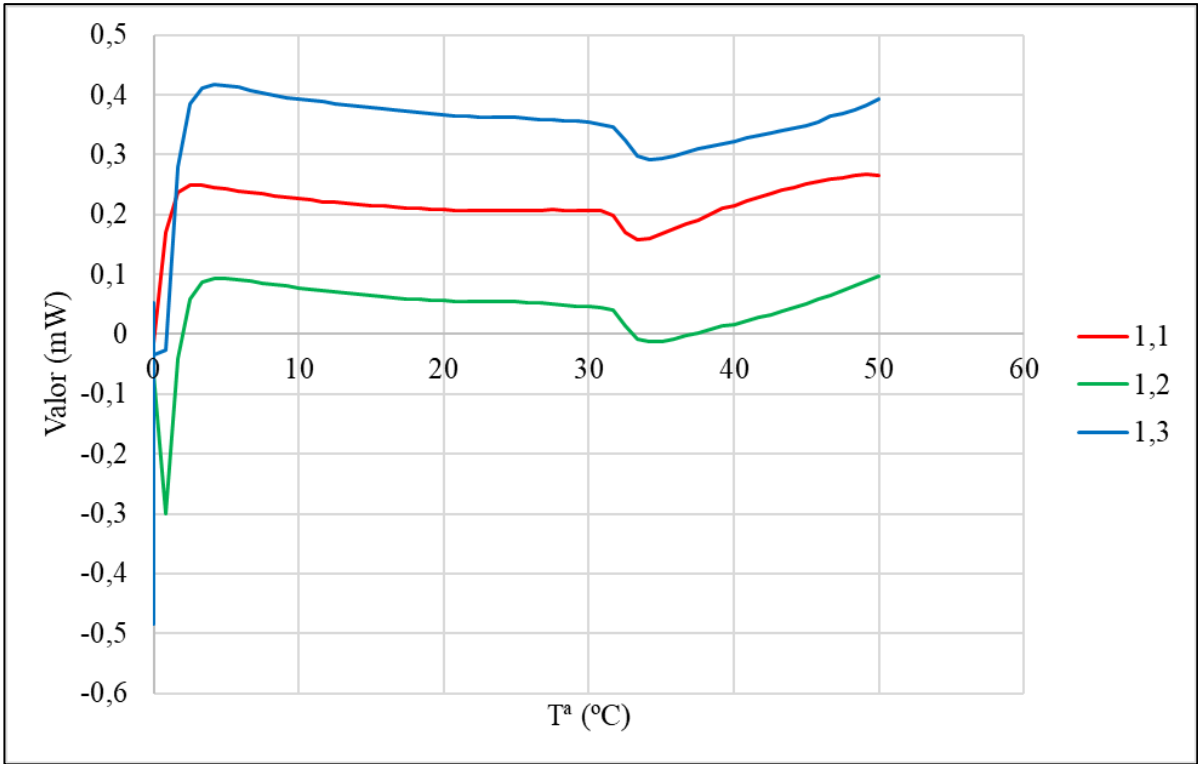
FIGURAS

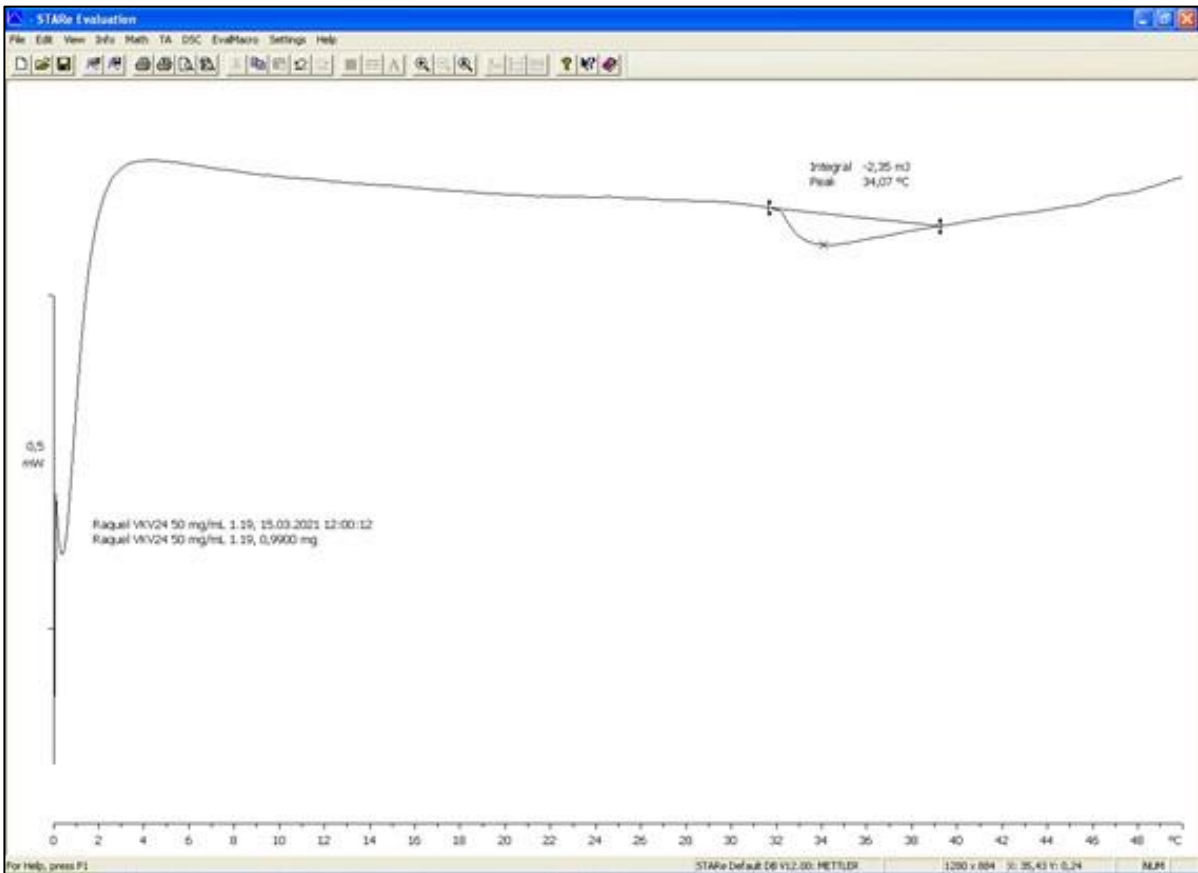
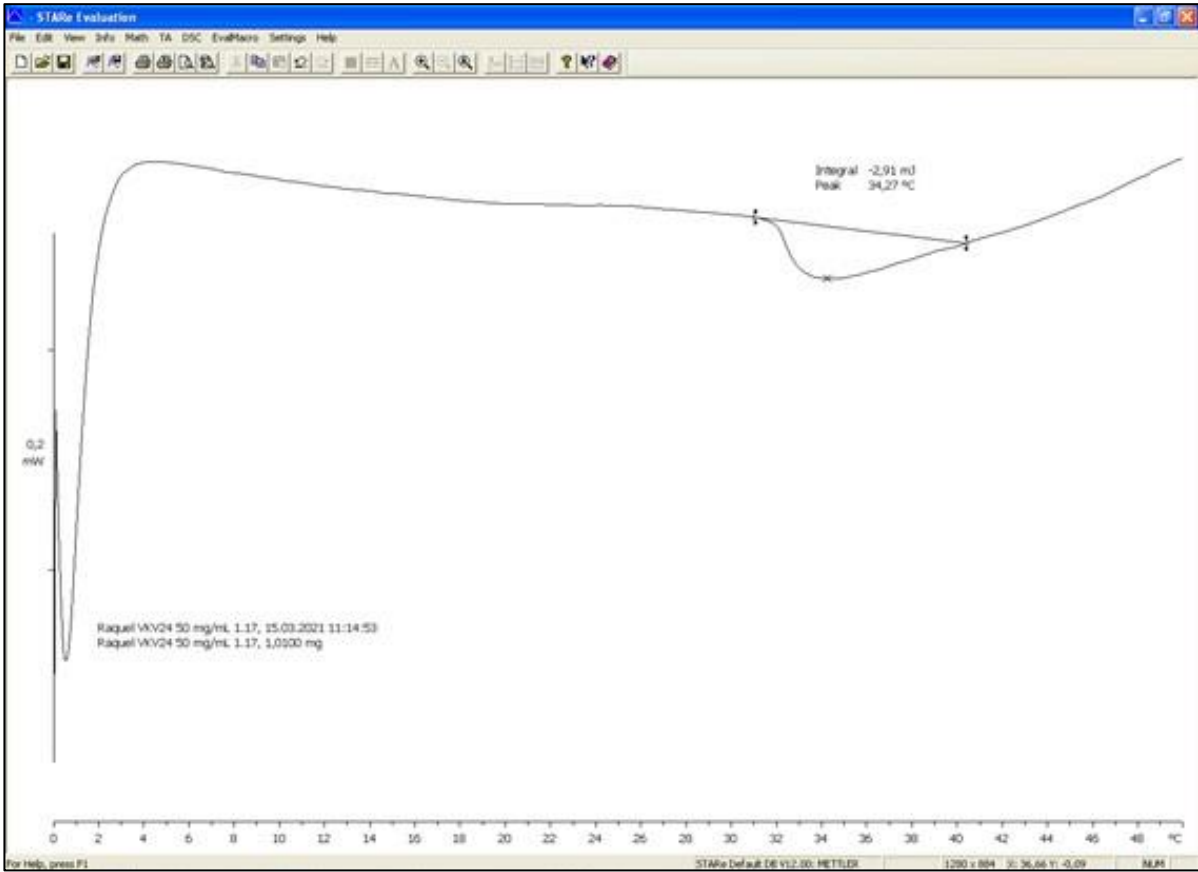
- Figura 1.** Estiramiento de una red de moléculas de elastina
- Figura 2.** Cambios en la estructura de los ELR en la transición inversa. Cadena extendida con estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de la cadena del polímero, y cadena plegada, con la horquilla β que forman los aminoácidos de la cadena del polímero por encima de la T_i de cada proceso
- Figura 3.** A: Representación de la estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de restos apolares. B: Esquema con la posición de los principales átomos que participan en la conformación en horquilla β de los polímeros tipo elastina

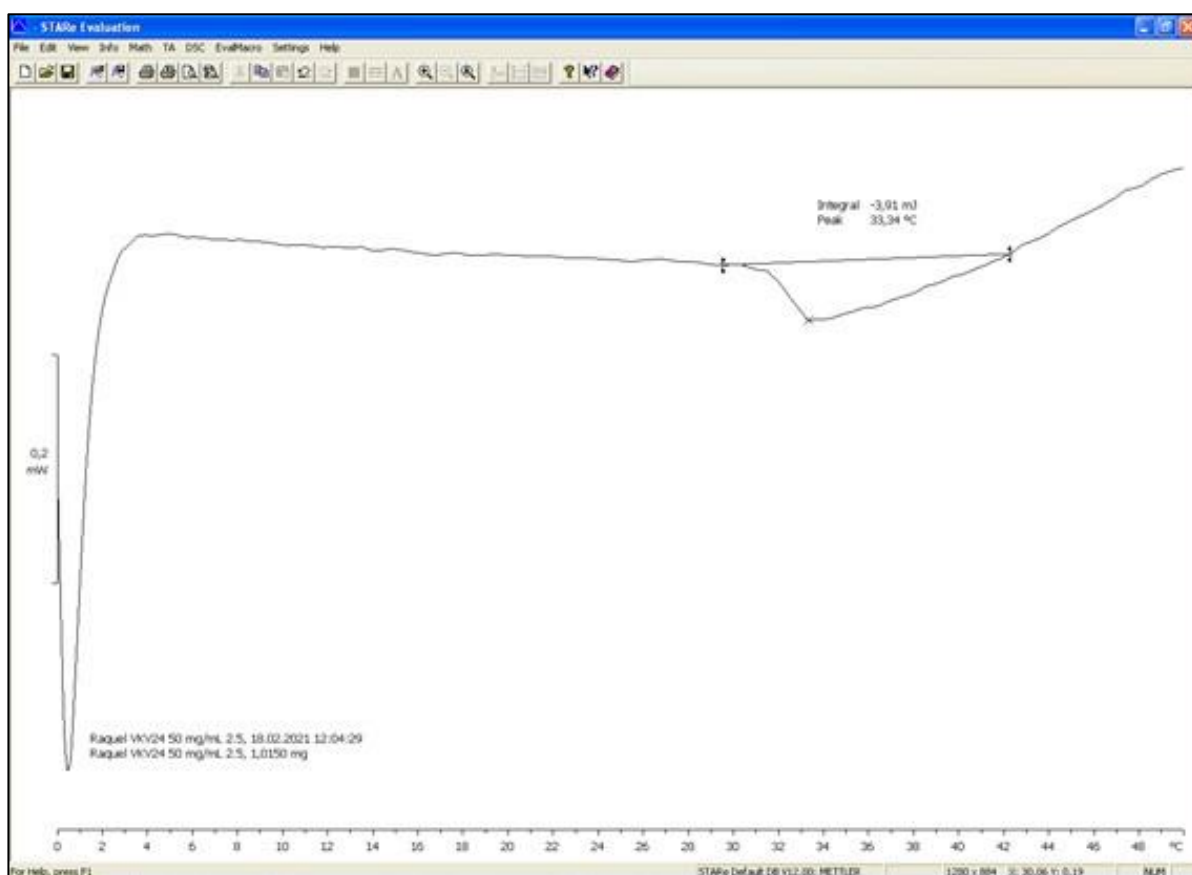
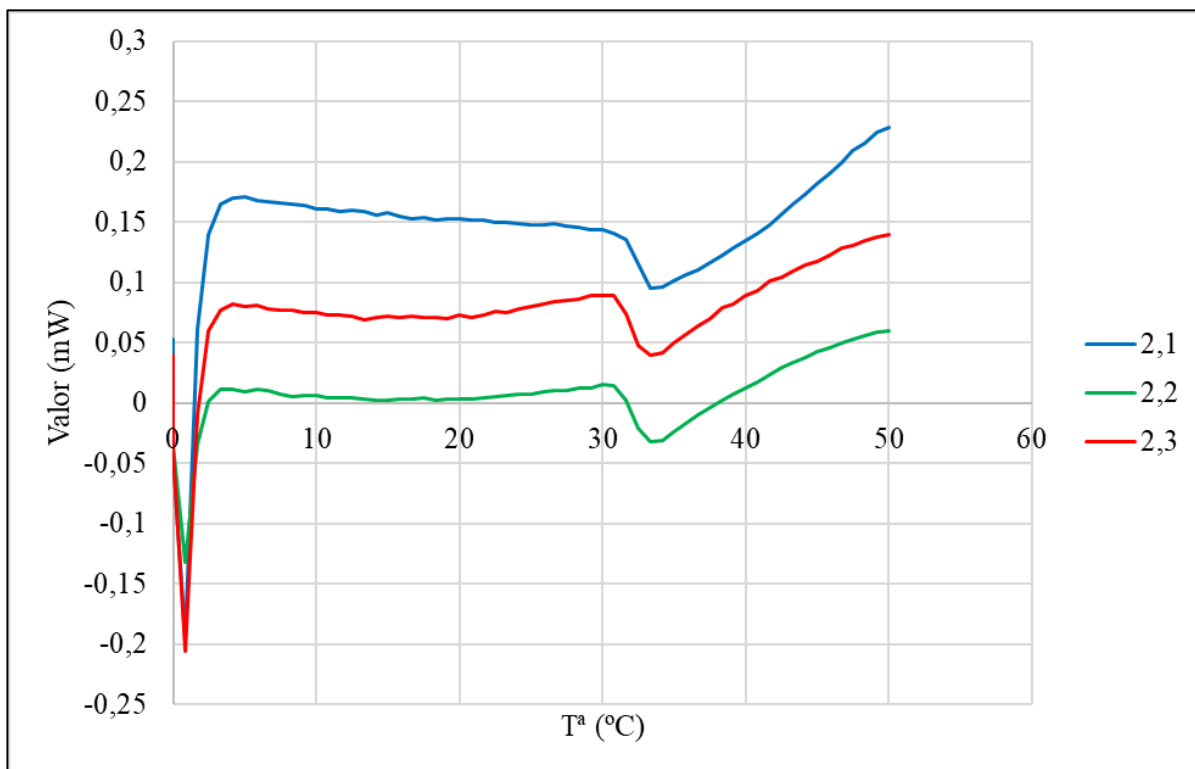
- Figura 4.** Termogramas: a) convencional (curva inferior, eje izquierdo), b) diferencial (curva superior, eje derecho)
- Figura 5.** Termogramas correspondientes a la descomposición de cinco polímeros
- Figura 6.** Esquema de un aparato de DSC
- Figura 7.** Imagen de la secuencia de aminoácidos del polímero VKVx24
- Figura 8.** Fotografía de los crisoles de aluminio
- Figura 9.** Fotografía de los crisoles de alúmina (óxido de aluminio)
- Figura 10.** Fotografía del soporte del crisol
- Figura 11.** Fotografía del cierracrisoles
- Figura 12.** Fotografía de la balanza analítica
- Figura 13.** Fotografía del pHmetro
- Figura 14.** Fotografía del a) aparato de TGA, b) horno
- Figura 15.** Fotografía del aparato de DSC
- Figura 16.** Fotografía del: a) horno, b) interior del horno
- Figura 17.** Fotografía del espectrofotómetro
- Figura 18.** Fotografía del polímero VKVx24
- Figura 19.** Fotografía de los discos de indio
- Figura 20.** Fotografía del crisol para la calibración del TGA
- Figura 21.** Gráfica del análisis 1 para TGA (termograma)
- Figura 22.** Gráfica del análisis 1 para TGA con el cálculo de pérdida de masa (termograma)
- Figura 23.** Gráfica DSC de la muestra 1, repetición 1
- Figura 24.** Gráfica DSC de la muestra 1, repetición 1 con el pico integrado
- Figura 25.** Gráfica de la muestra 1, repetición 1 para turbidimetría
- Figura 26.** Gráfica de la primera derivada de la muestra 1, repetición 1 para turbidimetría
- Figura 27.** Línea de calibrado para DSC
- Figura 28.** Línea de calibrado para turbidimetría

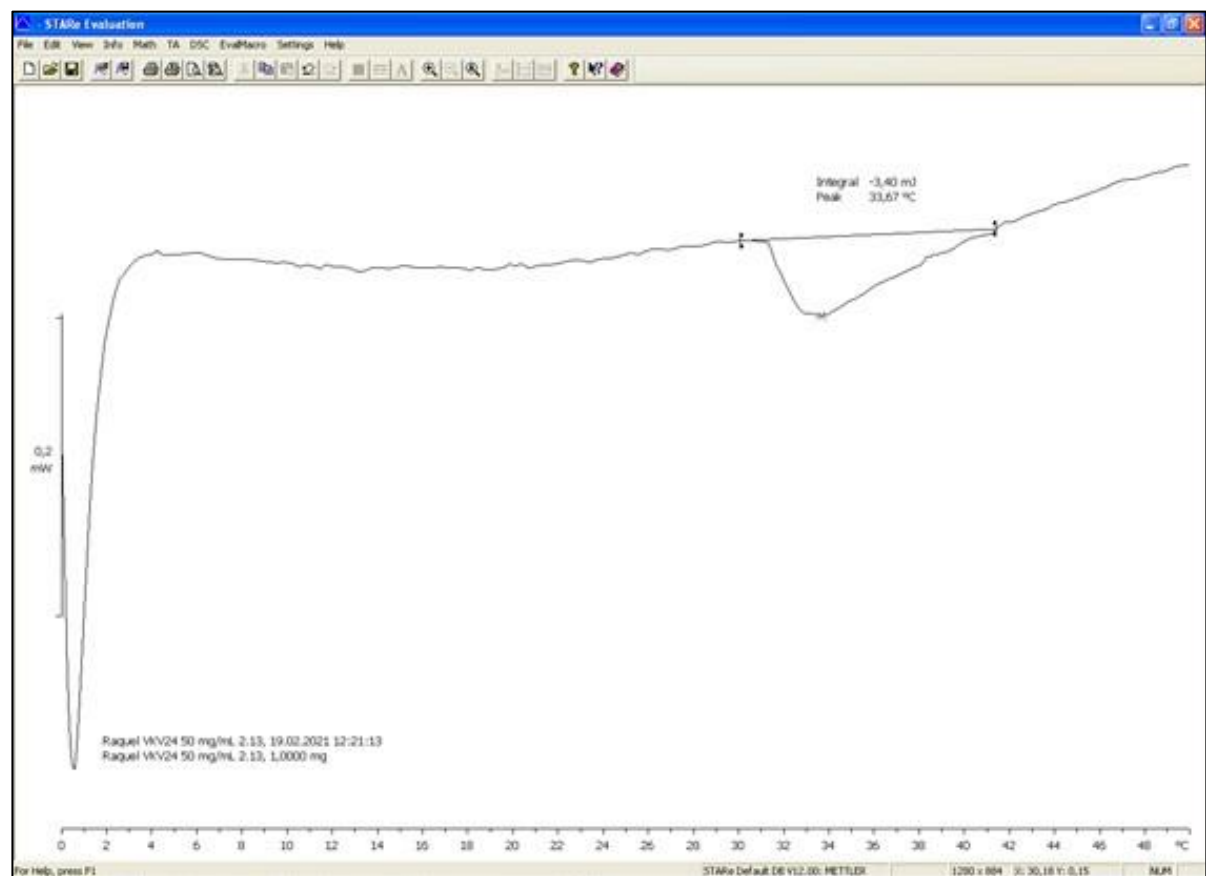
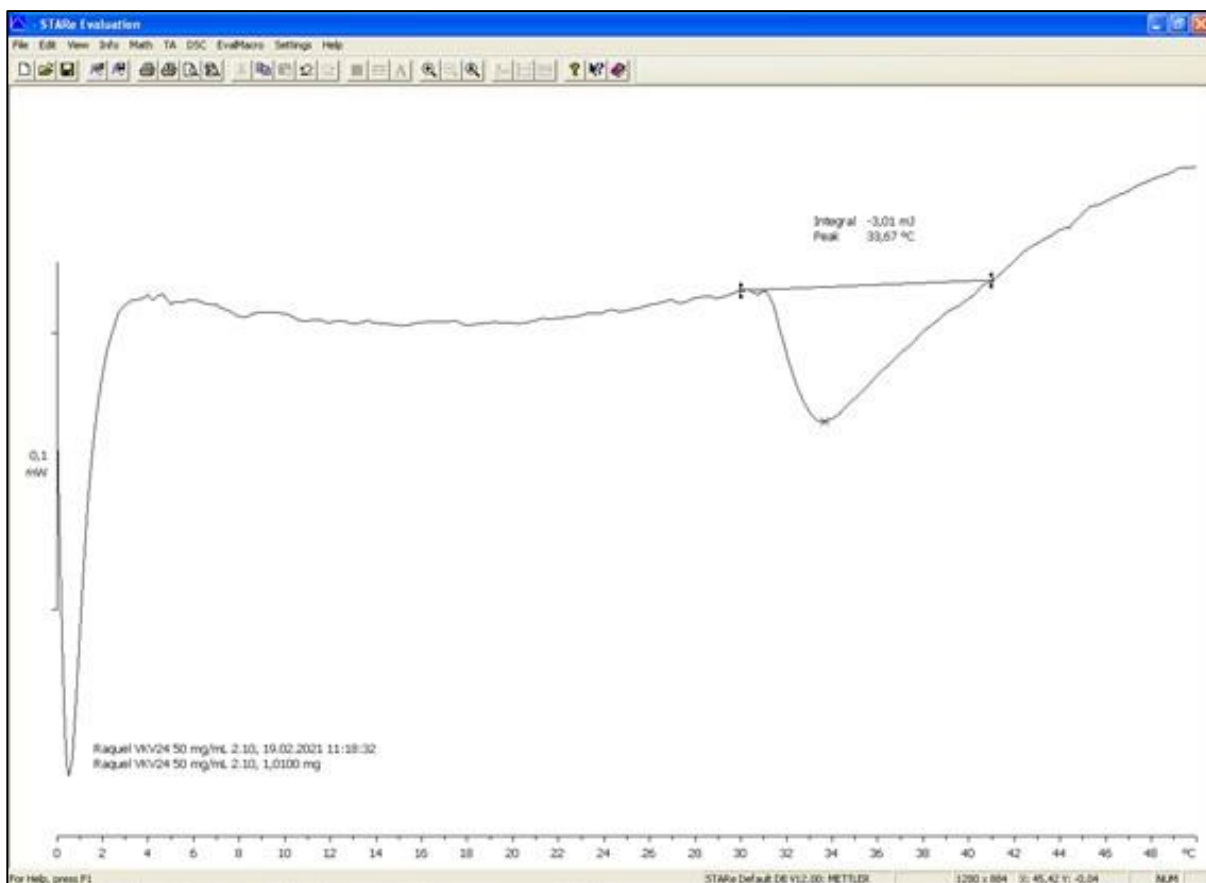


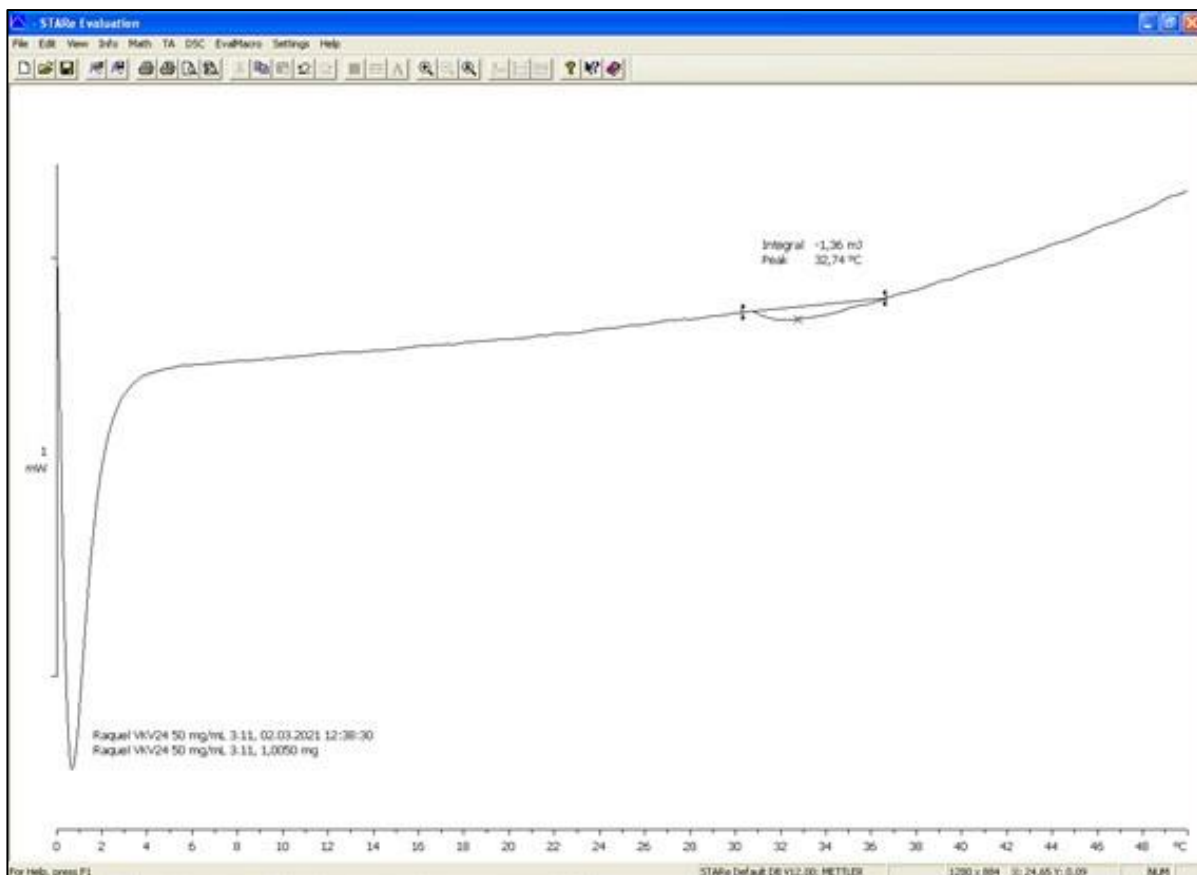
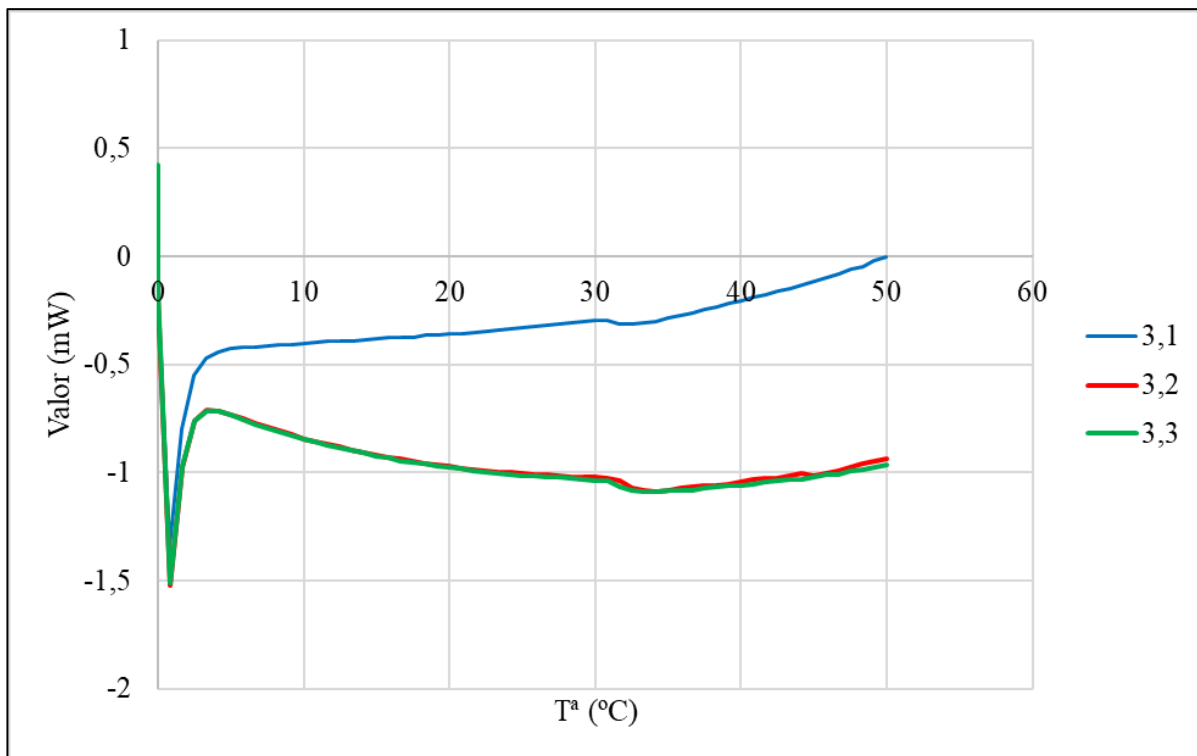


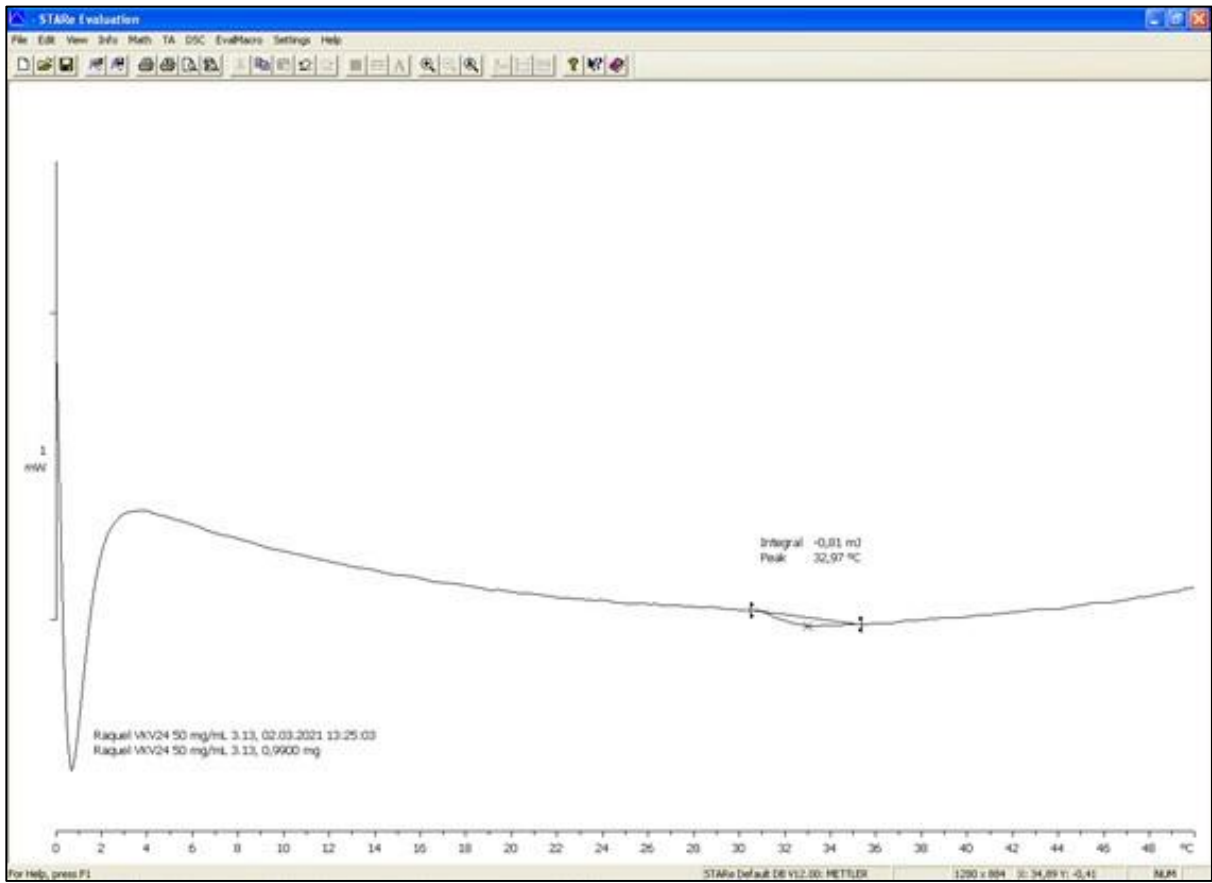
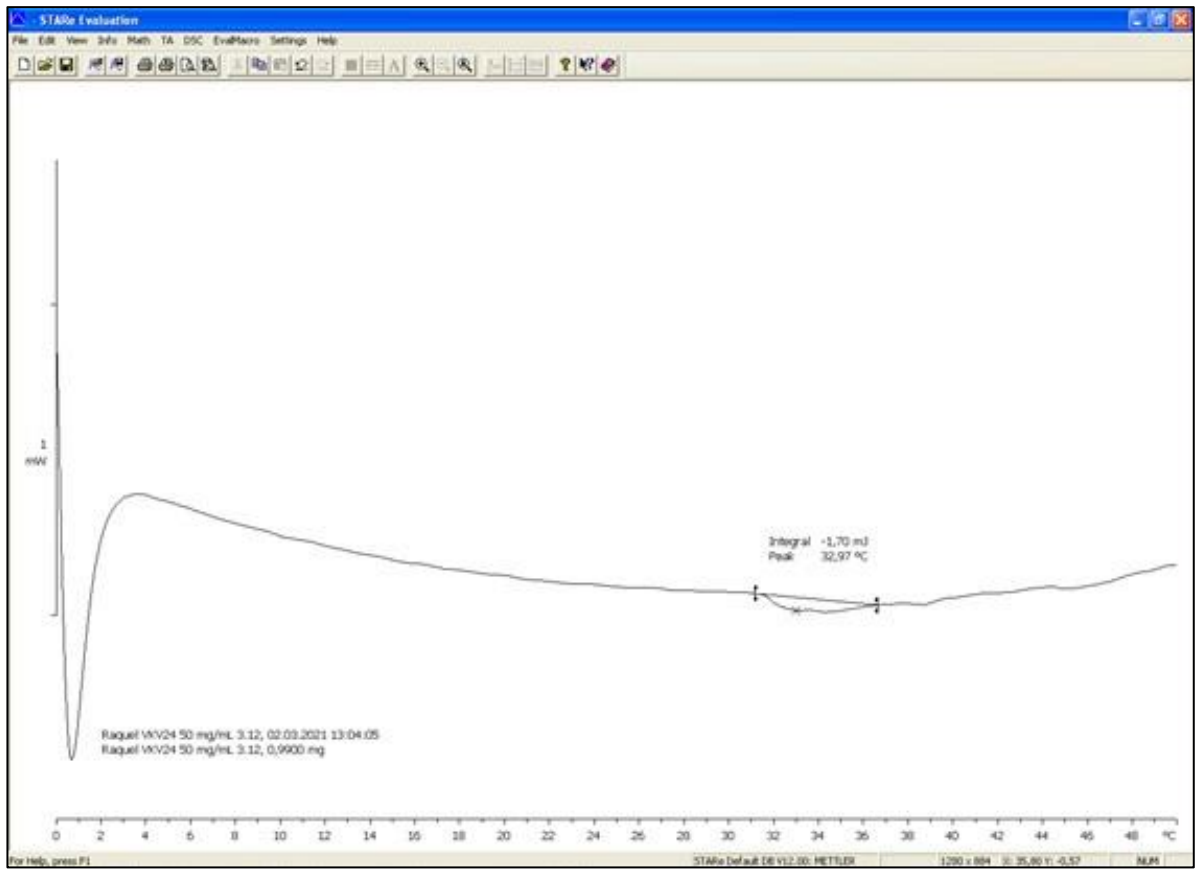


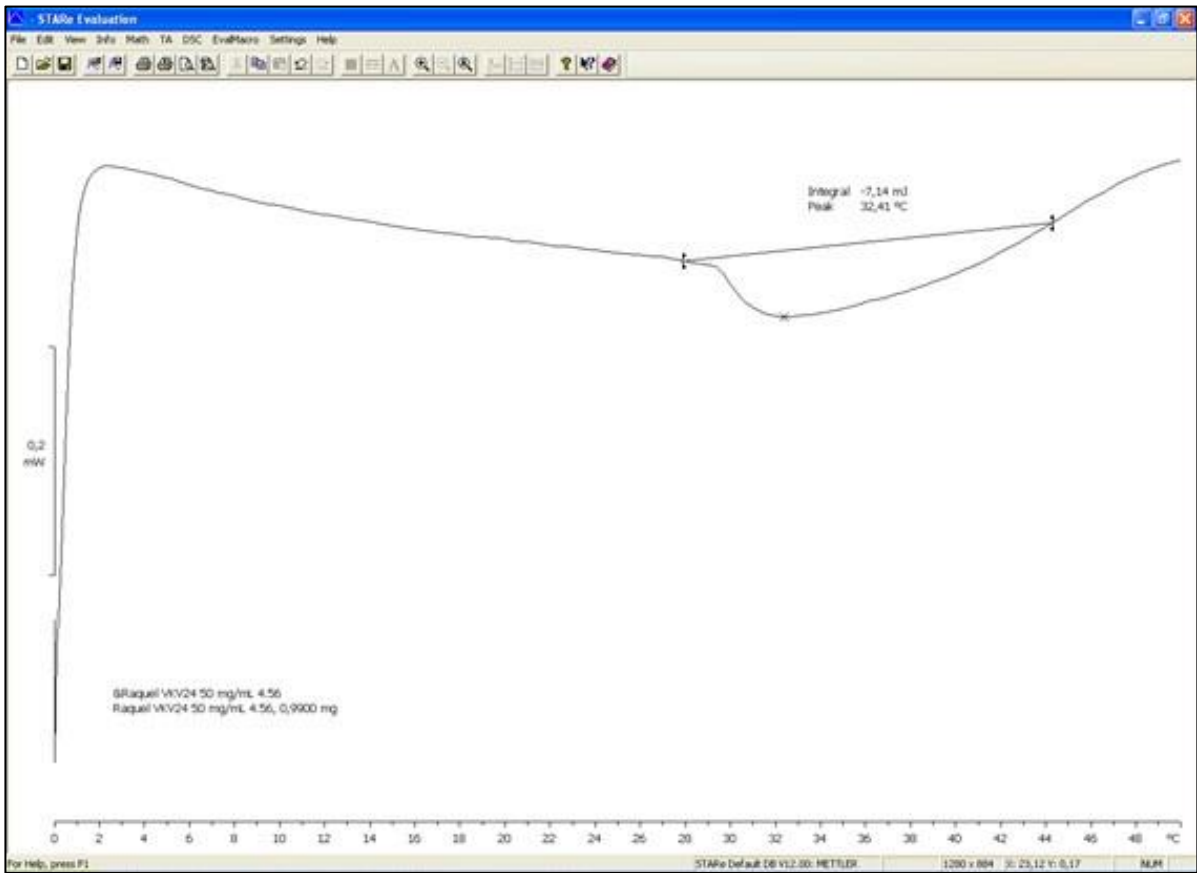
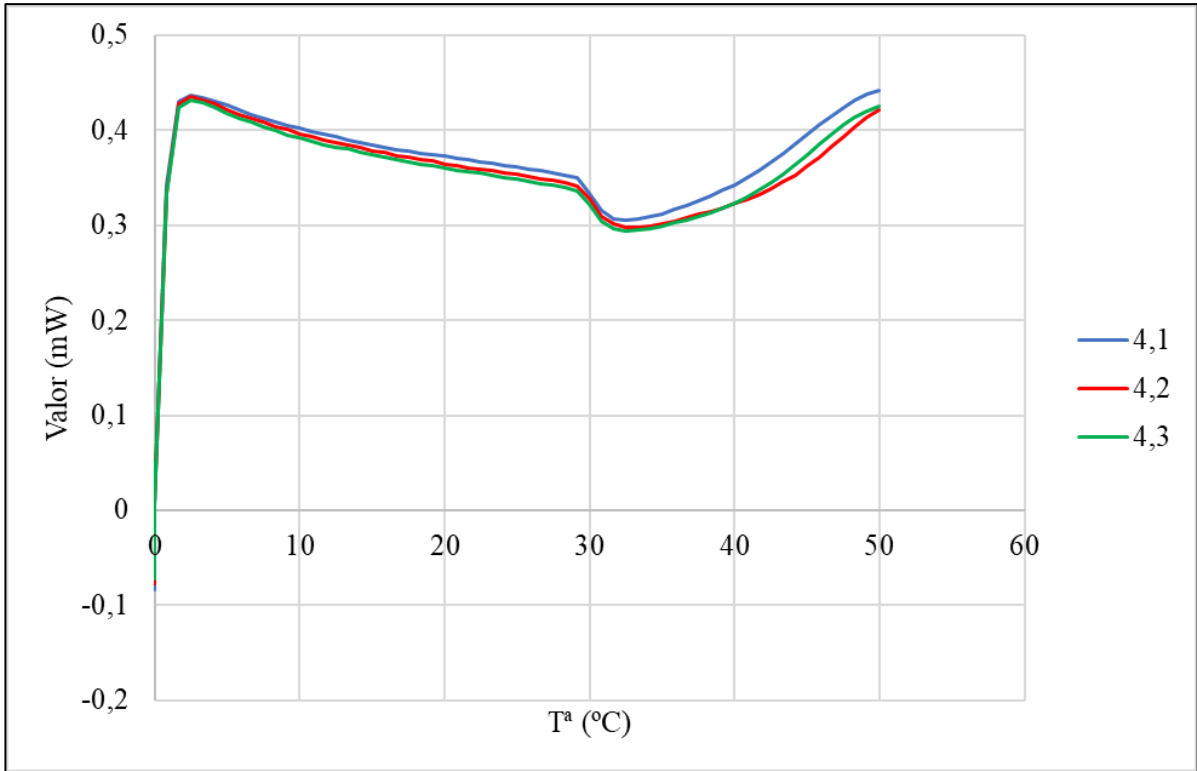


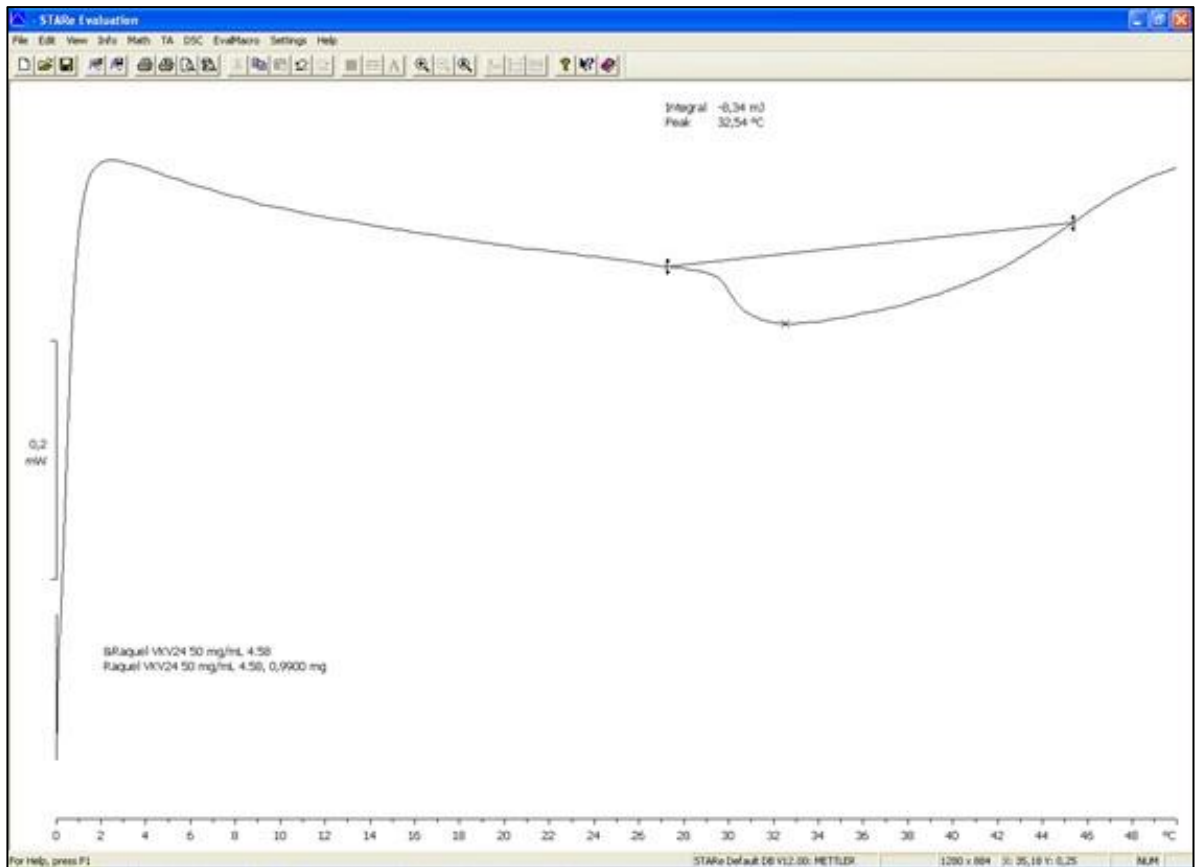
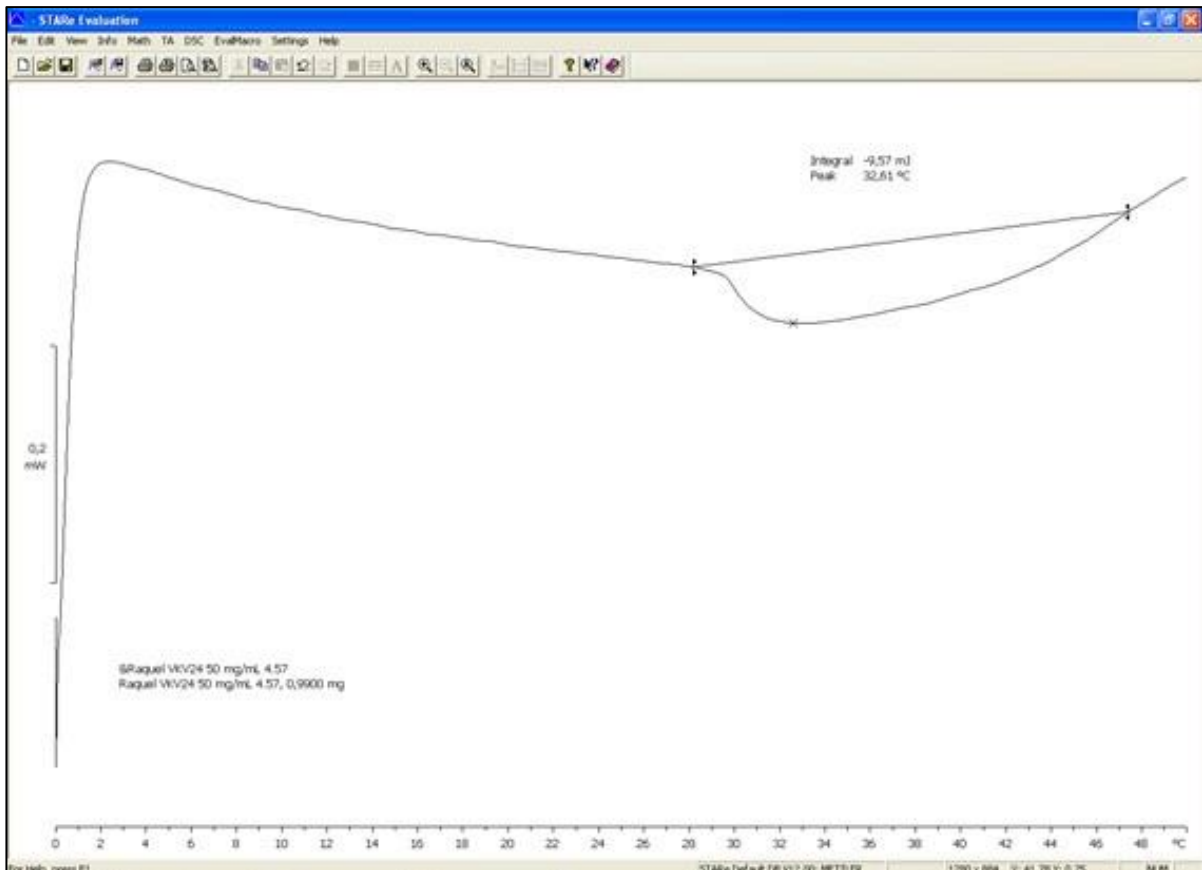


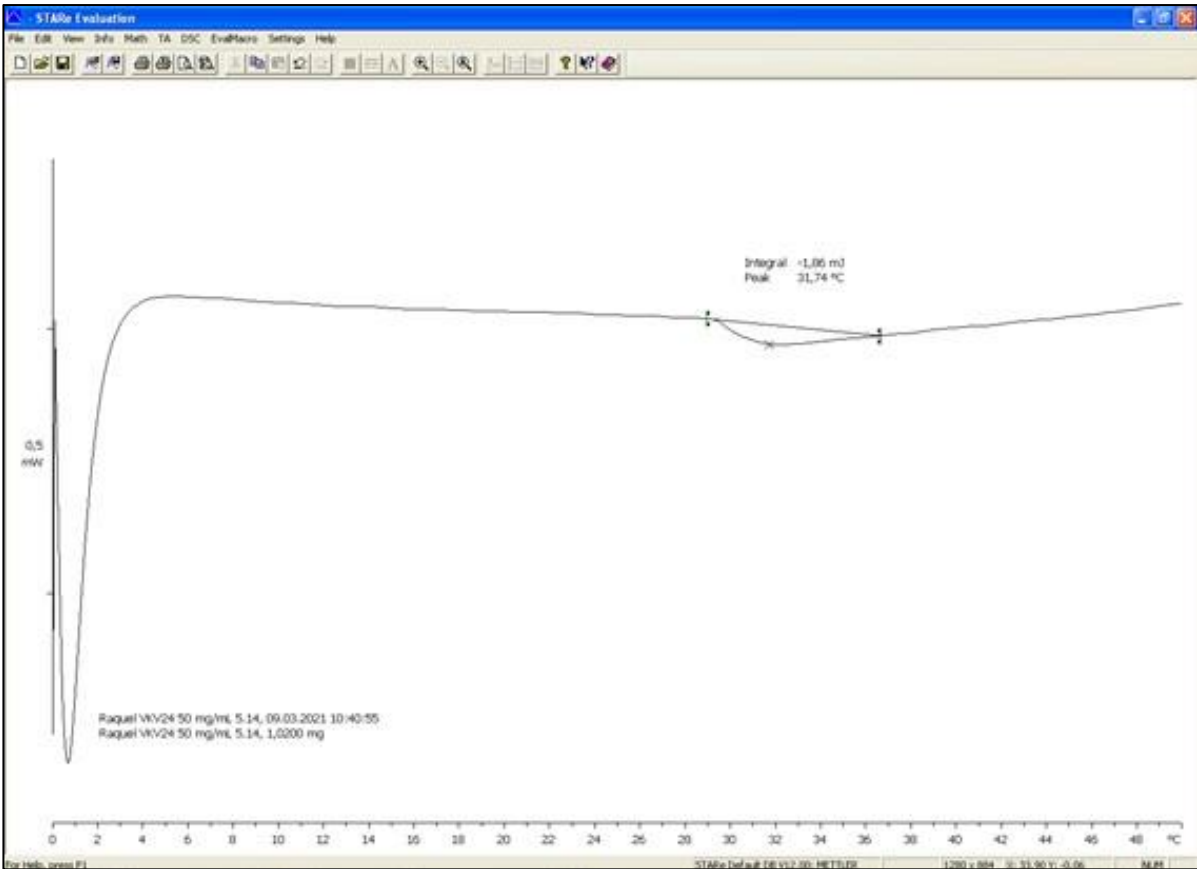
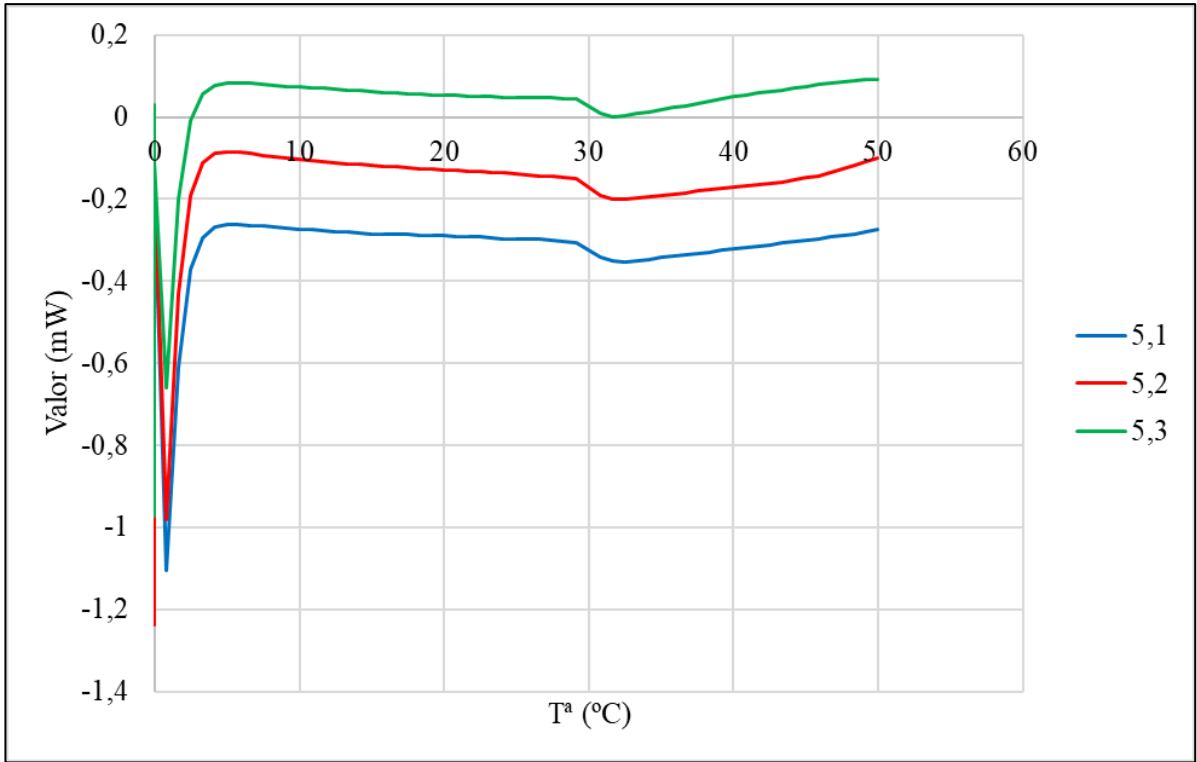


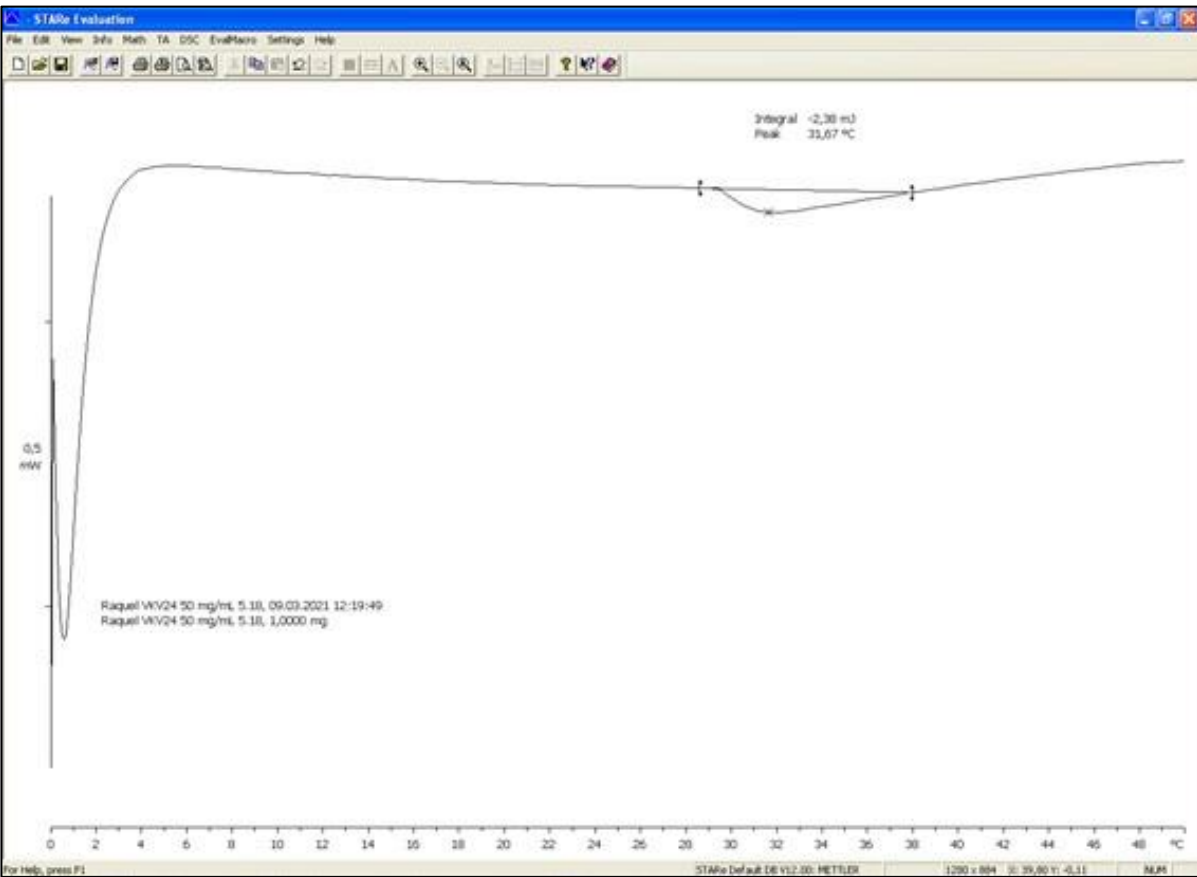
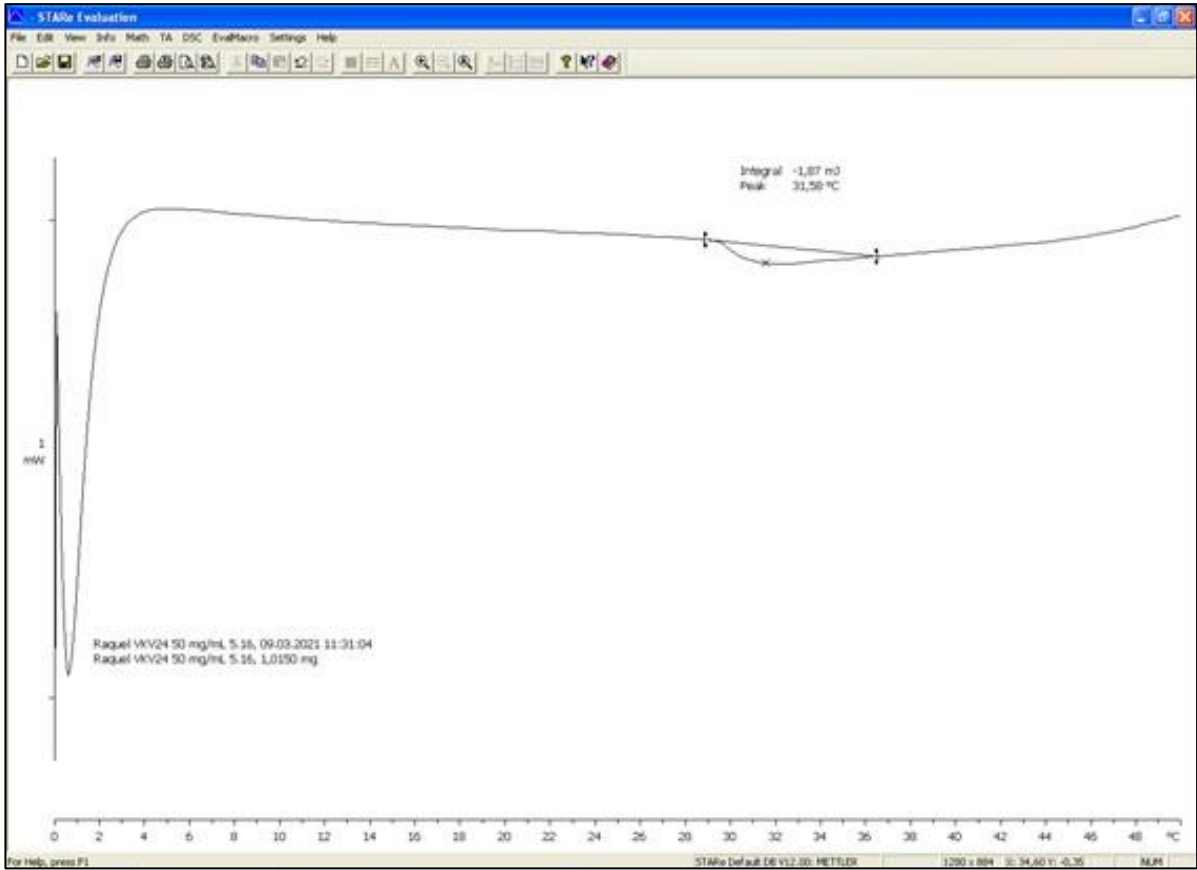


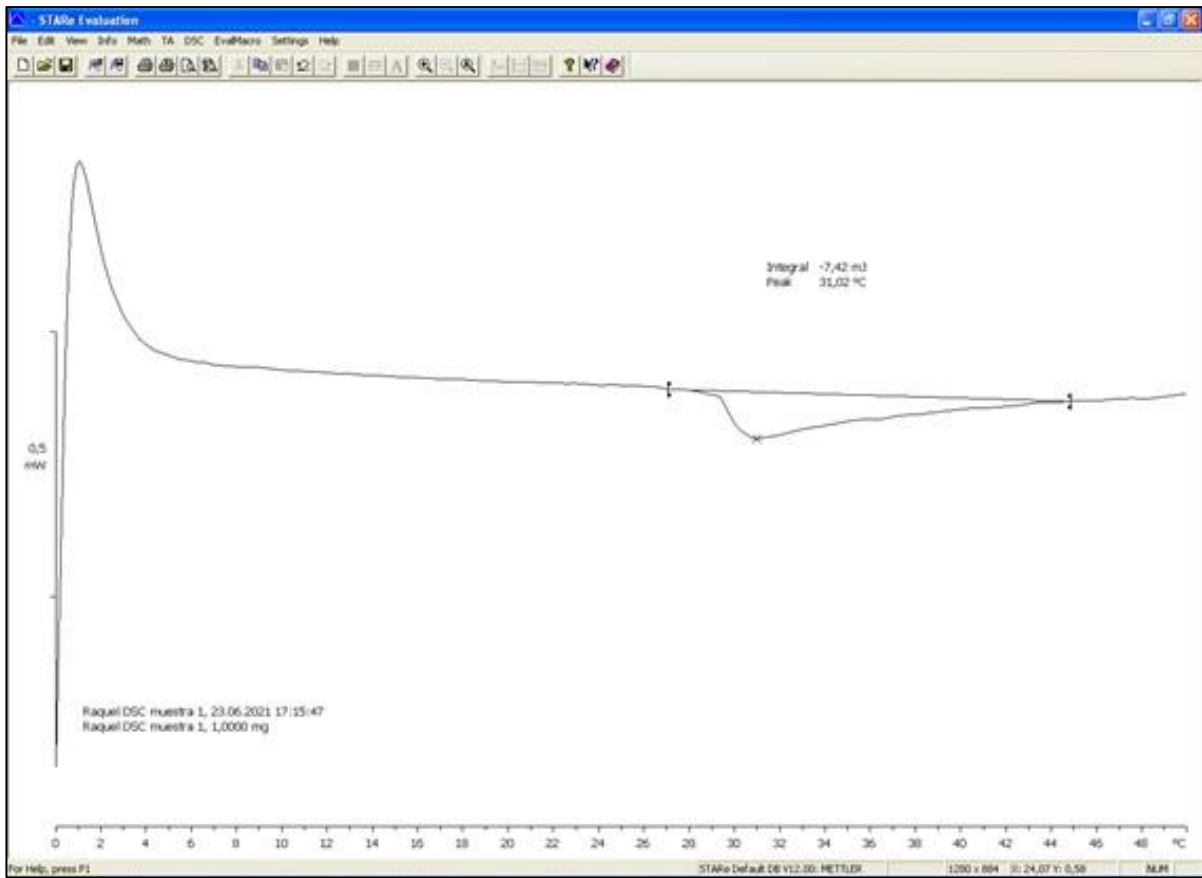
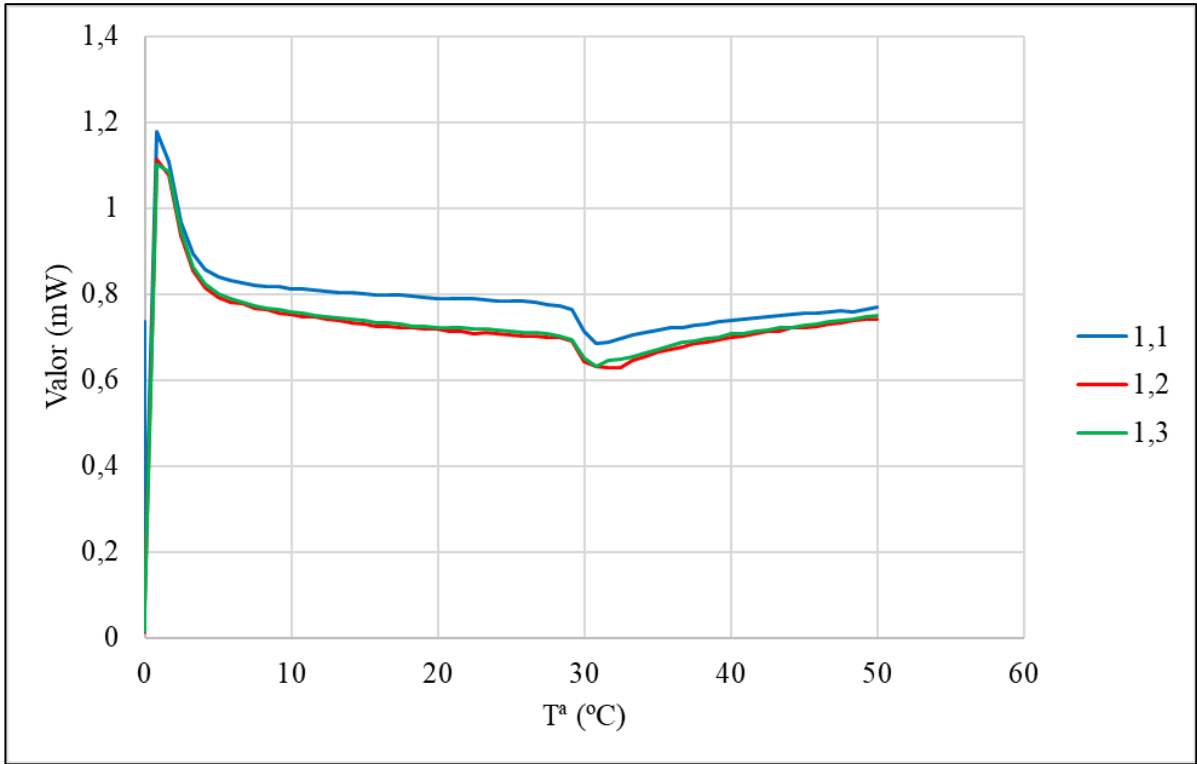


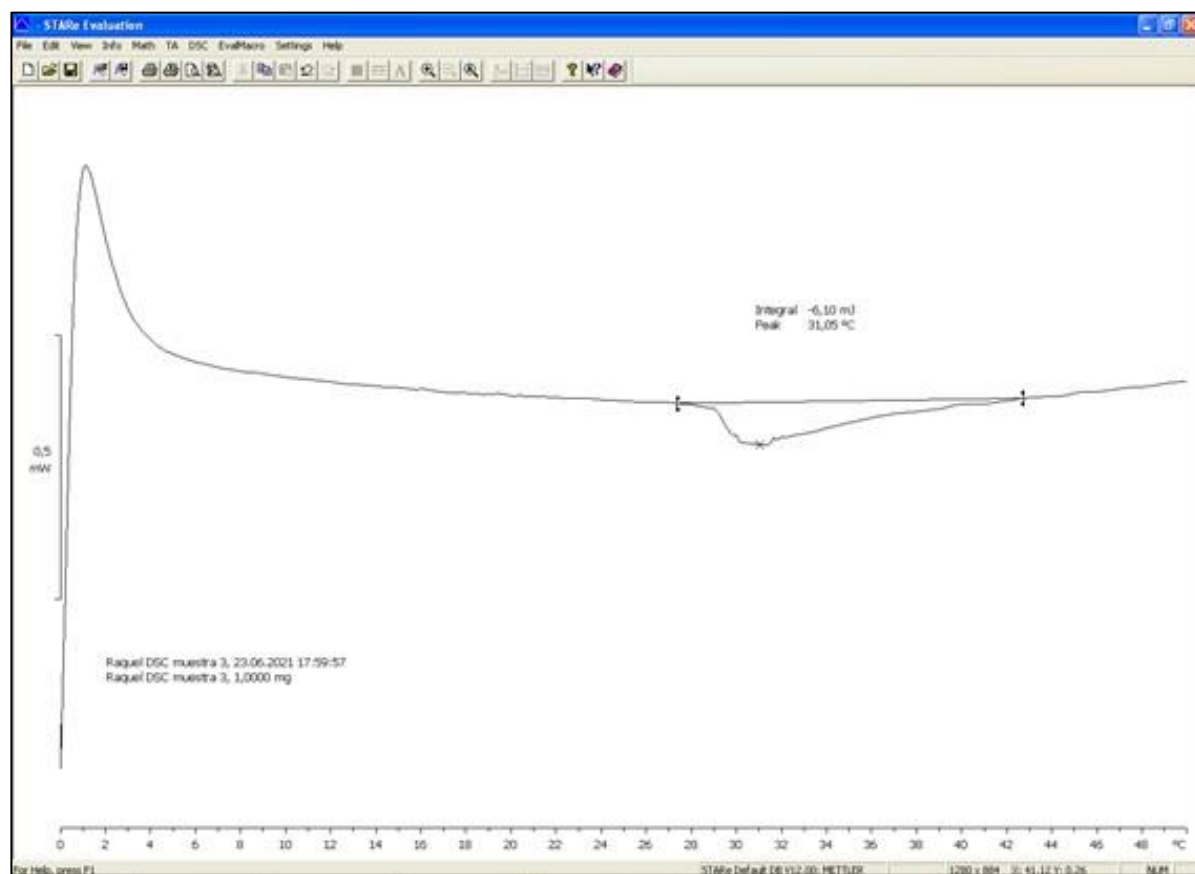
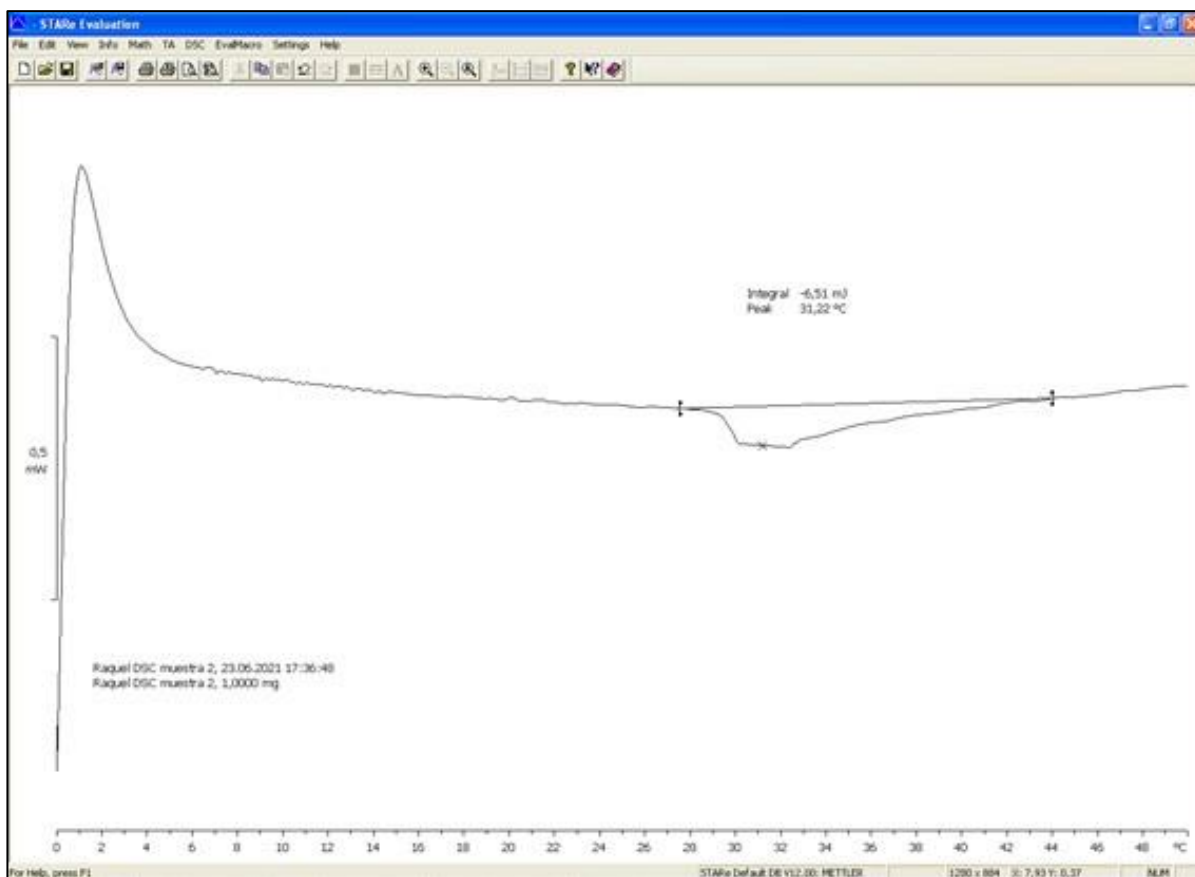




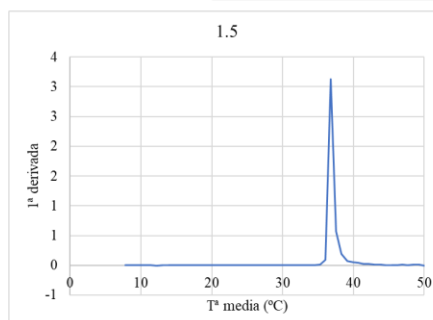
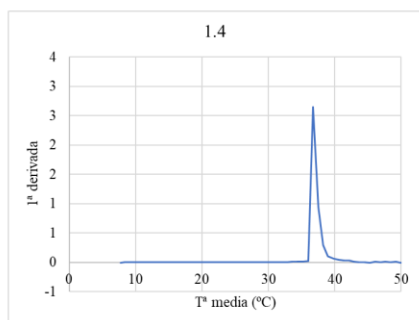
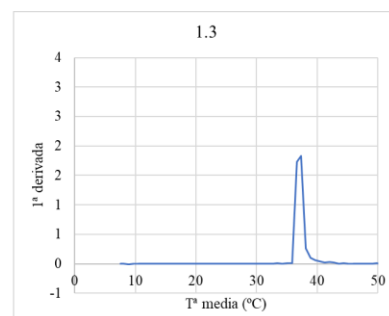
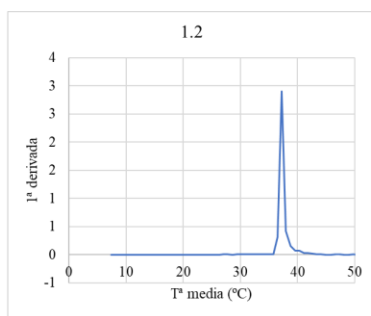
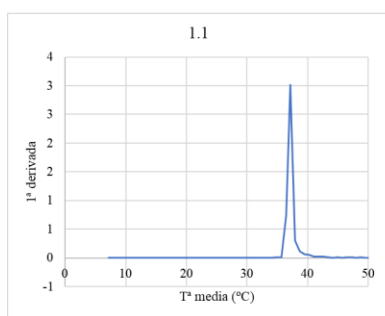
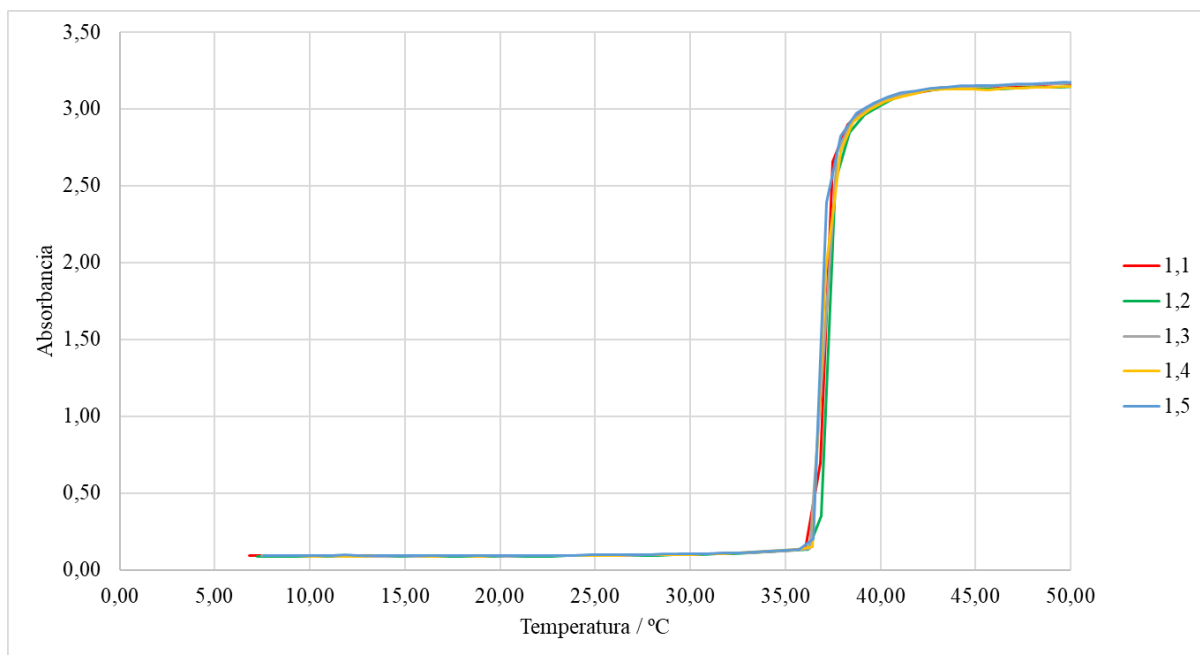




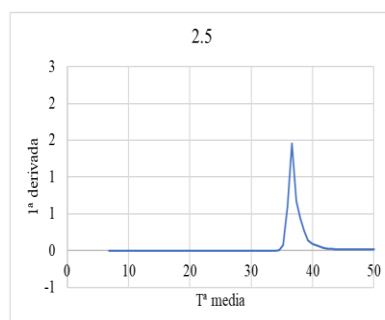
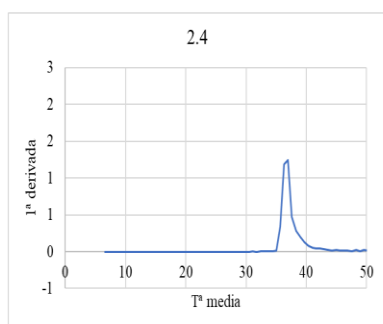
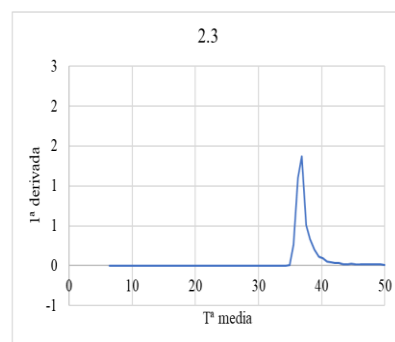
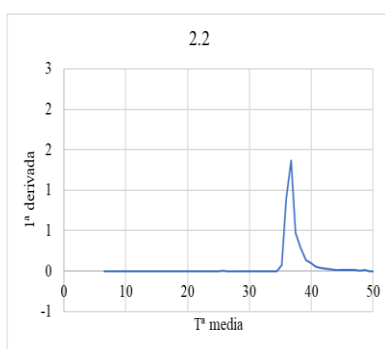
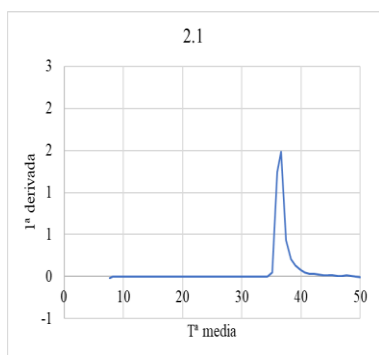
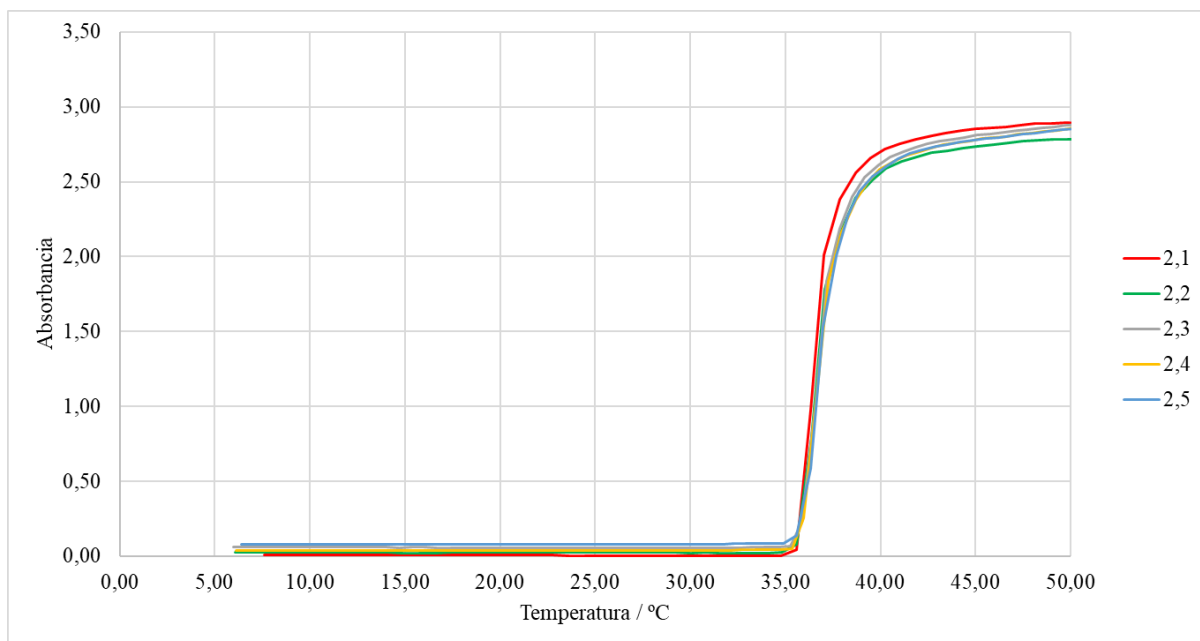




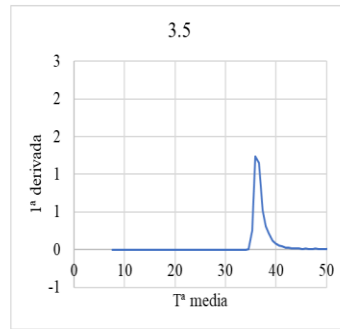
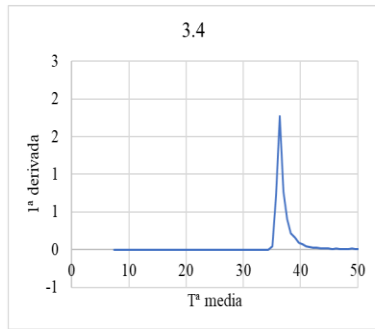
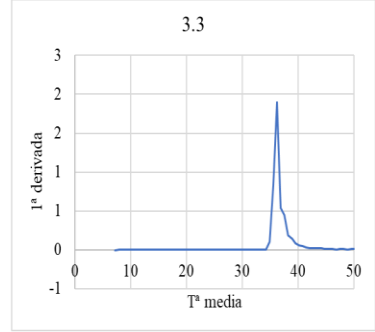
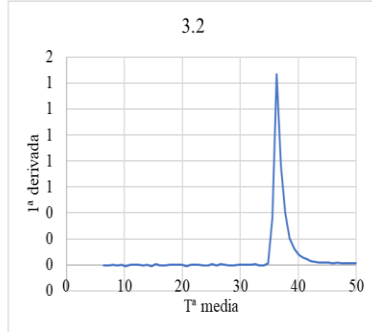
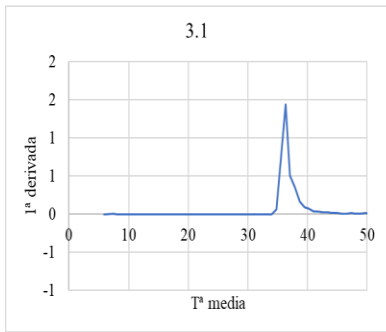
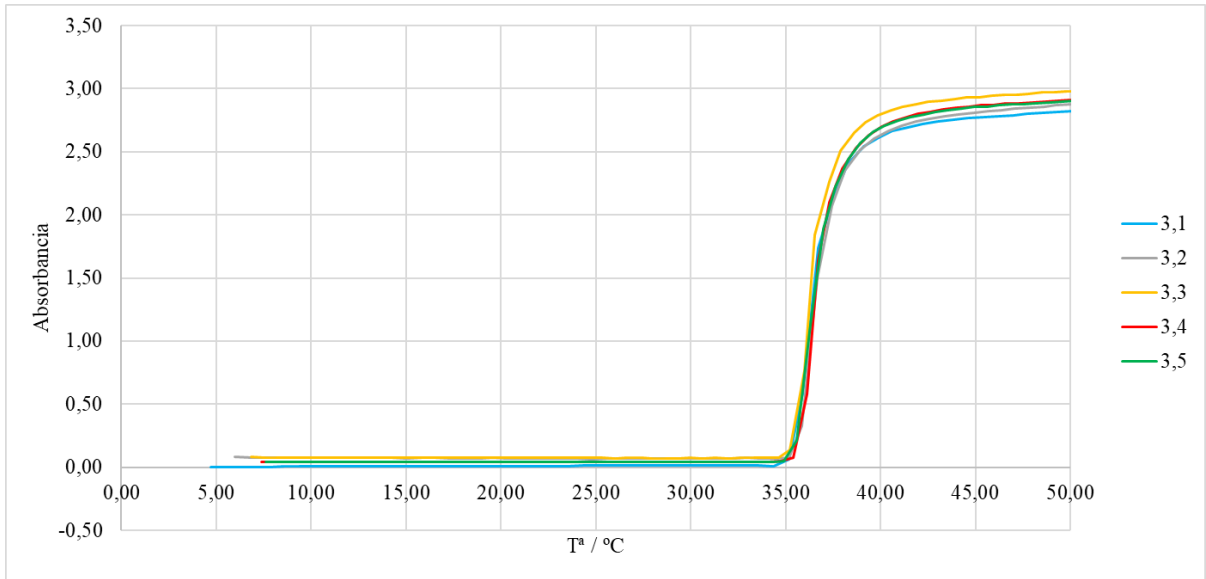
1.4 6,00-60,00°C Ramp 1				1.5 6,00-60,00°C Ramp 1			
Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada	Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada
7,67000	0,09190			7,57000	0,09477		
7,77000	0,09093	7,72000	-0,00964	7,97000	0,09378	7,77000	-0,00246
8,72000	0,09096	8,24500	0,00003	8,82000	0,09424	8,39500	0,00054
9,42000	0,09094	9,07000	-0,00004	9,62000	0,09512	9,22000	0,00110
10,27000	0,09063	9,84500	-0,00035	10,37000	0,09364	9,99500	-0,00198
11,02000	0,09097	10,64500	0,00044	11,10000	0,09487	10,73500	0,00168
11,82000	0,09043	11,42000	-0,00067	11,87000	0,09678	11,48500	0,00249
12,52000	0,09029	12,17000	-0,00020	12,62000	0,09406	12,24500	-0,00363
13,37000	0,09080	12,94500	0,00059	13,47000	0,09327	13,04500	-0,00094
14,17000	0,09098	13,77000	0,00023	14,27000	0,09445	13,87000	0,00148
14,87000	0,09111	14,52000	0,00019	14,97000	0,09374	14,62000	-0,00101
15,57000	0,09126	15,22000	0,00021	15,72000	0,09373	15,34500	-0,00001
16,47000	0,09049	16,02000	-0,00086	16,47000	0,09394	16,09500	0,00028
17,27000	0,09123	16,87000	0,00093	17,32000	0,09467	16,89500	0,00085
18,07000	0,09069	17,67000	-0,00068	18,22000	0,09418	17,77000	-0,00055
18,92000	0,09058	18,49500	-0,00013	18,92000	0,09452	18,57000	0,00049
19,62000	0,09203	19,27000	0,00207	19,72000	0,09438	19,32000	-0,00017
20,52000	0,09109	20,07000	-0,00104	20,62000	0,09452	20,17000	0,00015
21,22000	0,09206	20,87000	0,00138	21,42000	0,09480	21,02000	0,00035
22,07000	0,09235	21,64500	0,00034	22,17000	0,09574	21,79500	0,00126
22,82000	0,09280	22,44500	0,00061	23,02000	0,09533	22,59500	-0,00048
23,67000	0,09286	23,24500	0,00007	23,77000	0,09591	23,39500	0,00078
24,52000	0,09437	24,09500	0,00177	24,67000	0,09659	24,22000	0,00075
25,32000	0,09395	24,92000	-0,00052	25,42000	0,09722	25,04500	0,00083
26,07000	0,09428	25,69500	0,00044	26,22000	0,09811	25,82000	0,00111
26,87000	0,09653	26,47000	0,00281	26,97000	0,09851	26,59500	0,00055
27,62000	0,09698	27,24500	0,00060	27,82000	0,09990	27,39500	0,00163
28,41000	0,09753	28,01500	0,00069	28,57000	0,10284	28,19500	0,00392
29,27000	0,10074	28,84000	0,00374	29,37000	0,10298	28,97000	0,00018
30,02000	0,10205	29,64500	0,00175	30,02000	0,10453	29,69500	0,00238
30,73000	0,10442	30,37500	0,00333	30,82000	0,10706	30,42000	0,00317
31,52000	0,10759	31,12500	0,00401	31,67000	0,11009	31,24500	0,00356
32,37000	0,11058	31,94500	0,00353	32,52000	0,11363	32,09500	0,00416
33,17000	0,11490	32,77000	0,00539	33,27000	0,11727	32,89500	0,00486
33,97000	0,11985	33,57000	0,00620	34,07000	0,12157	33,67000	0,00538
34,72000	0,12551	34,34500	0,00754	34,92000	0,12730	34,49500	0,00673
35,57000	0,13186	35,14500	0,00746	35,72000	0,13433	35,32000	0,00879
36,42000	0,15169	35,99500	0,02333	36,47000	0,20200	36,09500	0,09022
37,10000	1,95191	36,76000	2,64738	37,17000	2,39342	36,82000	3,13062
37,92000	2,72622	37,51000	0,94428	37,92000	2,82312	37,54500	0,57293
38,57000	2,91482	38,24500	0,29014	38,72000	2,97288	38,32000	0,18720
39,42000	2,99768	38,99500	0,09748	39,62000	3,03451	39,17000	0,06848
40,22000	3,04613	39,82000	0,06057	40,37000	3,07667	39,99500	0,05621
41,02000	3,07914	40,62000	0,04126	41,07000	3,10403	40,72000	0,03908
41,82000	3,10138	41,42000	0,02779	41,87000	3,11879	41,47000	0,01845
42,52000	3,12235	42,17000	0,02996	42,62000	3,13456	42,24500	0,02103
43,32000	3,12931	42,92000	0,00870	43,40000	3,14157	43,01000	0,00899
44,02000	3,13108	43,67000	0,00253	44,27000	3,14984	43,83500	0,00950
44,92000	3,13022	44,47000	-0,00096	44,97000	3,15061	44,62000	0,00110
45,64000	3,12457	45,28000	-0,00785	45,82000	3,15368	45,39500	0,00361
46,52000	3,13553	46,08000	0,01246	46,57000	3,15632	46,19500	0,00352
47,22000	3,13580	46,87000	0,00039	47,27000	3,16139	46,92000	0,00724
48,02000	3,14272	47,62000	0,00865	48,07000	3,16149	47,67000	0,00013
48,77000	3,14278	48,39500	0,00008	48,92000	3,16771	48,49500	0,00732
49,62000	3,14796	49,19500	0,00609	49,67000	3,17353	49,29500	0,00775
50,27000	3,14424	49,94500	-0,00572	50,47000	3,16979	50,07000	-0,00467
51,07000	3,14279	50,67000	-0,00182	51,17000	3,16468	50,82000	-0,00731
51,87000	3,13926	51,47000	-0,00441	51,96000	3,15971	51,56500	-0,00629
52,67000	3,13657	52,27000	-0,00335	52,87000	3,15828	52,41500	-0,00156
53,42000	3,12662	53,04500	-0,01327	53,57000	3,15339	53,22000	-0,00700
54,17000	3,12232	53,79500	-0,00572	54,27000	3,14624	53,92000	-0,01021
54,97000	3,10954	54,57000	-0,01599	55,07000	3,13227	54,67000	-0,01747
55,77000	3,09557	55,37000	-0,01746	55,87000	3,12405	55,47000	-0,01027
56,52000	3,09349	56,14500	-0,00277	56,62000	3,11080	56,24500	-0,01767
57,27000	3,08028	56,89500	-0,01761	57,47000	3,09962	57,04500	-0,01315
58,17000	3,06707	57,72000	-0,01468	58,27000	3,09103	57,87000	-0,01074
58,92000	3,06520	58,54500	-0,00249	59,07000	3,08388	58,67000	-0,00893
59,72000	3,06657	59,32000	0,00171	59,77000	3,08289	59,42000	-0,00142
60,47000	3,06346	60,09500	-0,00415	60,62000	3,08525	60,19500	0,00277



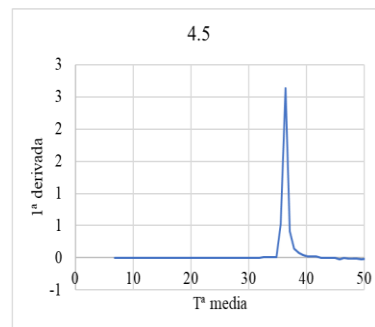
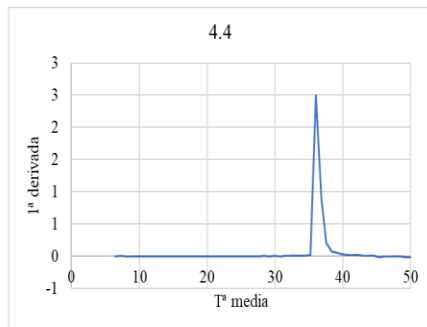
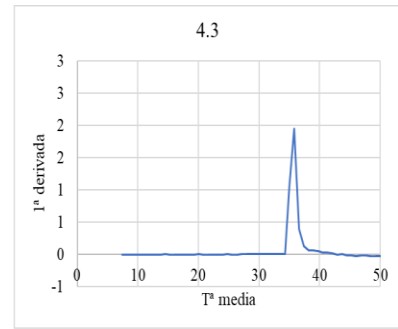
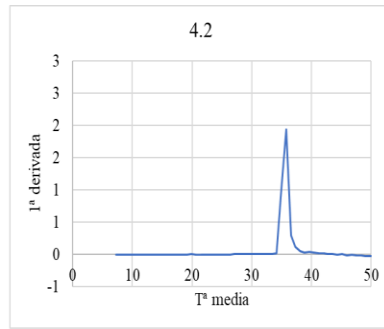
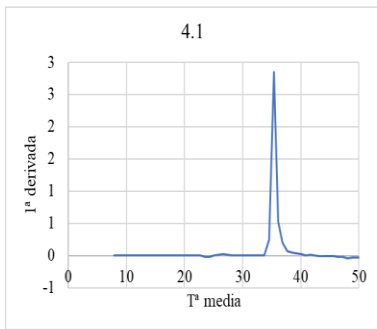
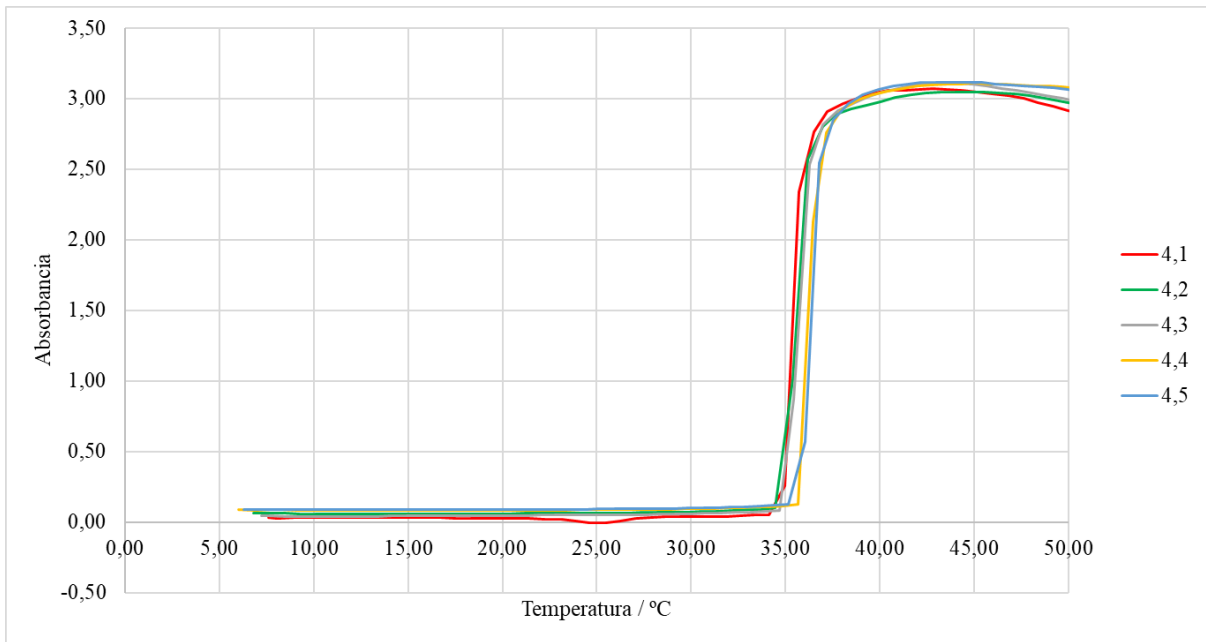
2.1 6,00-60,00°C Ramp 1				2.2 6,00-60,00°C Ramp 1			
Temperature (°C)	Abs	Tº media	Iº derivada	Temperature (°C)	Abs	Tº media	Iº derivada
7,62000	0,01015			6,07000	0,02396		
7,72000	0,00856	7,67000	-0,01594	7,07000	0,02382	6,57000	-0,00014
8,66000	0,00774	8,19000	-0,00087	7,82000	0,02382	7,44500	0,00000
9,42000	0,00685	9,04000	-0,00118	8,67000	0,02351	8,24500	-0,00037
10,27000	0,00692	9,84500	0,00008	9,42000	0,02337	9,04500	-0,00018
10,99000	0,00658	10,63000	-0,00046	10,22000	0,02350	9,82000	0,00016
11,80000	0,00669	11,39500	0,00013	10,97000	0,02335	10,59500	-0,00020
12,59000	0,00585	12,19500	-0,00106	11,87000	0,02348	11,42000	0,00015
13,37000	0,00538	12,98000	-0,00061	12,62000	0,02297	12,24500	-0,00068
14,22000	0,00635	13,79500	0,00114	13,42000	0,02293	13,02000	-0,00006
15,02000	0,00628	14,62000	-0,00008	14,14000	0,02298	13,78000	0,00008
15,82000	0,00611	15,42000	-0,00021	14,94000	0,02256	14,54000	-0,00053
16,62000	0,00630	16,22000	0,00024	15,74000	0,02208	15,34000	-0,00060
17,37000	0,00595	16,99500	-0,00047	16,52000	0,02264	16,13000	0,00071
18,17000	0,00645	17,77000	0,00062	17,42000	0,02309	16,97000	0,00051
18,92000	0,00601	18,54500	-0,00058	18,17000	0,02334	17,79500	0,00033
19,77000	0,00532	19,34500	-0,00082	18,97000	0,02381	18,57000	0,00059
20,47000	0,00591	20,12000	0,00085	19,72000	0,02340	19,34500	-0,00054
21,27000	0,00651	20,87000	0,00075	20,57000	0,02329	20,14500	-0,00013
22,07000	0,00540	21,67000	-0,00138	21,32000	0,02335	20,94500	0,00007
22,82000	0,00514	22,44500	-0,00035	22,17000	0,02289	21,74500	-0,00054
23,67000	0,00451	23,24500	-0,00074	22,92000	0,02338	22,54500	0,00066
24,47000	0,00425	24,07000	-0,00033	23,67000	0,02327	23,29500	-0,00015
25,22000	0,00432	24,84500	0,00010	24,57000	0,02355	24,12000	0,00031
26,02000	0,00429	25,62000	-0,00004	25,32000	0,02287	24,94500	-0,00090
26,87000	0,00383	26,44500	-0,00054	26,12000	0,02363	25,72000	0,00094
27,62000	0,00327	27,24500	-0,00075	26,82000	0,02344	26,47000	-0,00027
28,42000	0,00318	28,02000	-0,00012	27,62000	0,02328	27,22000	-0,00019
29,27000	0,00341	28,84500	0,00028	28,47000	0,02274	28,04500	-0,00064
30,02000	0,00299	29,64500	-0,00057	29,27000	0,02284	28,87000	0,00013
30,77000	0,00262	30,39500	-0,00048	30,02000	0,02258	29,64500	-0,00034
31,53000	0,00181	31,15000	-0,00106	30,82000	0,02291	30,42000	0,00040
32,37000	0,00257	31,95000	0,00090	31,57000	0,02263	31,19500	-0,00037
33,17000	0,00299	32,77000	0,00052	32,37000	0,02238	31,97000	-0,00031
33,92000	0,00214	33,54500	-0,00113	33,22000	0,02242	32,79500	0,00004
34,77000	0,00235	34,34500	0,00024	34,02000	0,02244	33,62000	0,00003
35,57000	0,04085	35,17000	0,04812	34,82000	0,02282	34,42000	0,00047
36,32000	0,97416	35,94500	1,24442	35,57000	0,07863	35,19500	0,07441
37,02000	2,01309	36,67000	1,48417	36,37000	0,79344	35,97000	0,89351
37,87000	2,38009	37,44500	0,43177	37,09000	1,77938	36,73000	1,36937
38,72000	2,55826	38,29500	0,20962	37,90000	2,16370	37,49500	0,47447
39,47000	2,65733	39,09500	0,13209	38,69000	2,39676	38,29500	0,29501
40,22000	2,71858	39,84500	0,08166	39,57000	2,51348	39,13000	0,13264
41,02000	2,75550	40,62000	0,04616	40,29000	2,58869	39,93000	0,10446
41,87000	2,78487	41,44500	0,03455	41,11000	2,63391	40,70000	0,05514
42,67000	2,80735	42,27000	0,02811	41,90000	2,66661	41,50500	0,04140
43,37000	2,82389	43,02000	0,02363	42,70000	2,69207	42,30000	0,03182
44,27000	2,83908	43,82000	0,01687	43,52000	2,70914	43,11000	0,02082
45,02000	2,85088	44,64500	0,01574	44,32000	2,72235	43,92000	0,01651
45,82000	2,86091	45,42000	0,01254	45,07000	2,73459	44,69500	0,01633
46,57000	2,86841	46,19500	0,01000	45,92000	2,74818	45,49500	0,01599
47,32000	2,87608	46,94500	0,01023	46,72000	2,75998	46,32000	0,01475
48,12000	2,88725	47,72000	0,01396	47,47000	2,76929	47,09500	0,01241
49,02000	2,89116	48,57000	0,00434	48,27000	2,77452	47,87000	0,00655
49,77000	2,89286	49,39500	0,00228	49,07000	2,78434	48,67000	0,01227
50,57000	2,88701	50,17000	-0,00731	49,82000	2,78298	49,44500	-0,00182
51,37000	2,87027	50,97000	-0,02093	50,67000	2,78308	50,24500	0,00012
52,08000	2,83612	51,72500	-0,04809	51,37000	2,77842	51,02000	-0,00665
52,87000	2,73718	52,47500	-0,12525	52,27000	2,76809	51,82000	-0,01148
53,62000	2,51865	53,24500	-0,29136	52,97000	2,74585	52,62000	-0,03177
54,52000	2,06667	54,07000	-0,50220	53,77000	2,69064	53,37000	-0,06902
55,24000	1,46002	54,88000	-0,84257	54,57000	2,56501	54,17000	-0,15703
56,07000	0,97817	55,65500	-0,58054	55,37000	2,31825	54,97000	-0,30845
56,84000	0,74696	56,45500	-0,30027	56,17000	1,79962	55,77000	-0,64829
57,67000	0,62724	57,25500	-0,14424	56,92000	1,23914	56,54500	-0,74731
58,47000	0,52924	58,07000	-0,12250	57,72000	0,75388	57,32000	-0,60656
59,27000	0,46646	58,87000	-0,07848	58,57000	0,56172	58,14500	-0,22607
59,97000	0,40797	59,62000	-0,08356	59,27000	0,45527	58,92000	-0,15208
				60,02000	0,36943	59,64500	-0,11445



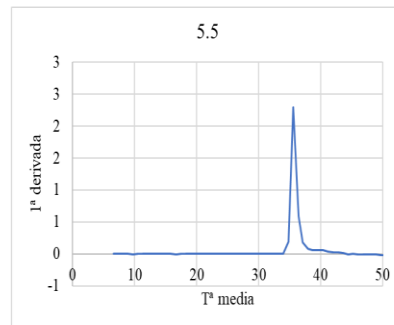
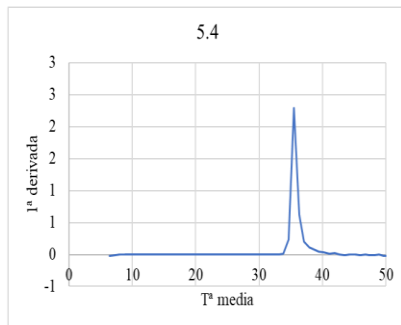
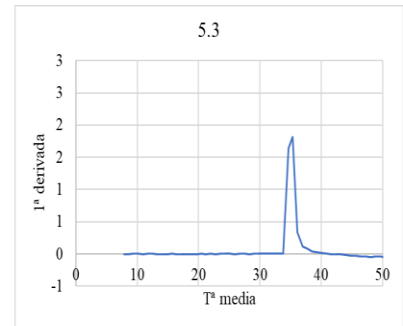
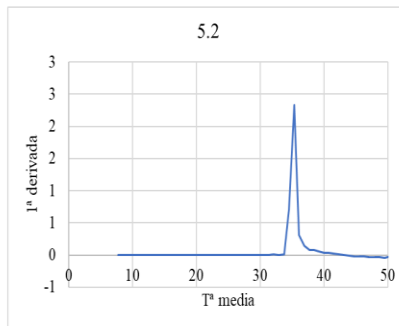
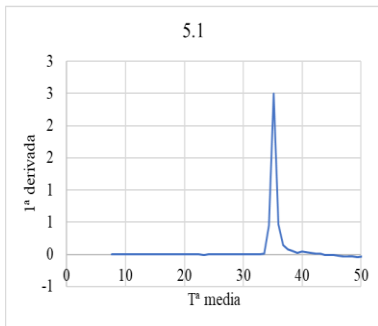
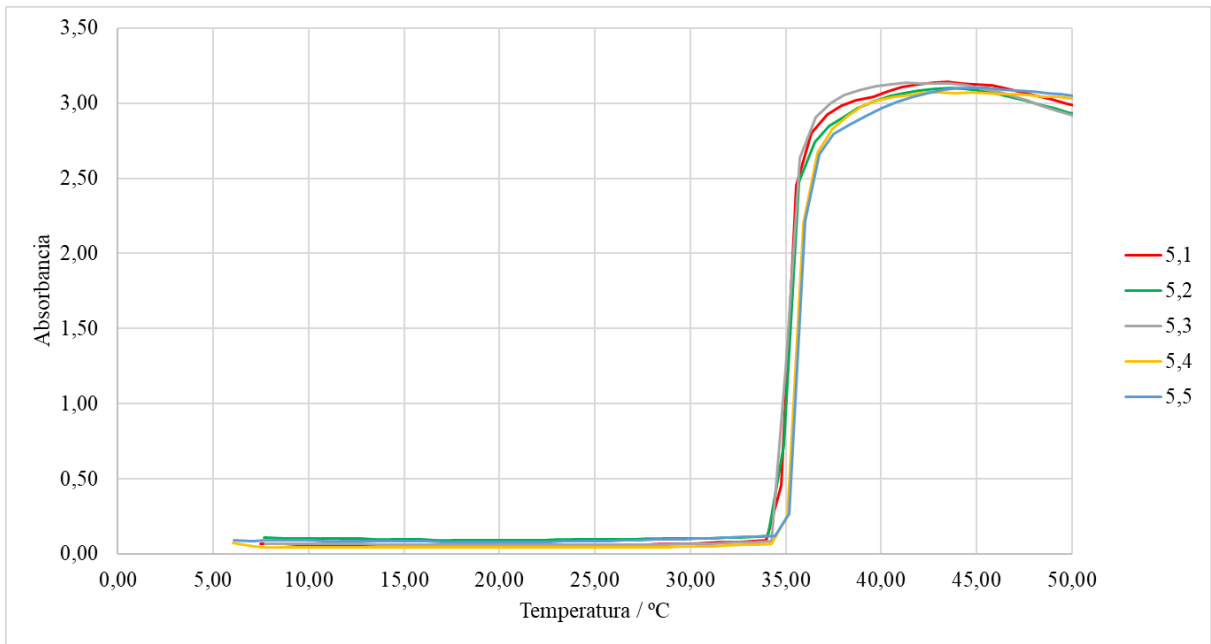
3.1 6,00-60,00°C Ramp 1				3.2 6,00-60,00°C Ramp 1			
Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada	Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada
4,72000	-0,00012			5,97000	0,08288		
7,12000	0,00260	5,92000	0,00113	6,92000	0,07877	6,44500	-0,00433
7,77000	0,00396	7,44500	0,00210	7,67000	0,07679	7,29500	-0,00264
8,57000	0,00459	8,17000	0,00079	8,37000	0,07830	8,02000	0,00216
9,37000	0,00521	8,97000	0,00077	9,07000	0,07573	8,72000	-0,00367
10,05000	0,00595	9,71000	0,00109	9,92000	0,07913	9,49500	0,00399
10,87000	0,00667	10,46000	0,00088	10,62000	0,07337	10,27000	-0,00823
11,57000	0,00727	11,22000	0,00086	11,42000	0,07456	11,02000	0,00149
12,40000	0,00792	11,98500	0,00078	12,17000	0,07573	11,79500	0,00156
13,27000	0,00826	12,83500	0,00039	12,87000	0,07612	12,52000	0,00057
14,06000	0,00862	13,66500	0,00046	13,57000	0,07405	13,22000	-0,00296
14,82000	0,00886	14,44000	0,00032	14,31000	0,07655	13,94000	0,00338
15,61000	0,00973	15,21500	0,00110	15,02000	0,07057	14,66500	-0,00842
16,37000	0,00943	15,99000	-0,00040	15,82000	0,07592	15,42000	0,00669
17,17000	0,00973	16,77000	0,00038	16,57000	0,07361	16,19500	-0,00307
17,99000	0,00973	17,58000	-0,00001	17,37000	0,07240	16,97000	-0,00152
18,87000	0,01013	18,43000	0,00046	18,12000	0,07173	17,74500	-0,00089
19,62000	0,01026	19,24500	0,00017	18,87000	0,07161	18,49500	-0,00016
20,42000	0,01044	20,02000	0,00023	19,57000	0,07294	19,22000	0,00190
21,22000	0,01102	20,82000	0,00073	20,32000	0,07210	19,94500	-0,00112
21,96000	0,01109	21,59000	0,00009	21,02000	0,06724	20,67000	-0,00694
22,72000	0,01117	22,34000	0,00011	21,82000	0,06846	21,42000	0,00152
23,47000	0,01123	23,09500	0,00009	22,50000	0,06914	22,16000	0,00100
24,32000	0,01162	23,89500	0,00046	23,24000	0,07048	22,87000	0,00182
25,07000	0,01149	24,69500	-0,00018	24,07000	0,06674	23,65500	-0,00450
25,77000	0,01173	25,42000	0,00035	24,77000	0,06467	24,42000	-0,00296
26,61000	0,01162	26,19000	-0,00013	25,52000	0,06963	25,14500	0,00661
27,37000	0,01197	26,99000	0,00046	26,22000	0,06697	25,87000	-0,00380
28,17000	0,01210	27,77000	0,00016	27,02000	0,07055	26,62000	0,00448
28,92000	0,01205	28,54500	-0,00006	27,72000	0,07218	27,37000	0,00233
29,67000	0,01216	29,29500	0,00015	28,52000	0,07003	28,12000	-0,00270
30,42000	0,01205	30,04500	-0,00016	29,17000	0,06726	28,84500	-0,00426
31,22000	0,01215	30,82000	0,00013	29,94000	0,06952	29,55500	0,00294
31,97000	0,01226	31,59500	0,00015	30,77000	0,07010	30,35500	0,00070
32,82000	0,01170	32,39500	-0,00066	31,42000	0,07036	31,09500	0,00040
33,60000	0,01211	33,21000	0,00052	32,22000	0,07022	31,82000	-0,00017
34,37000	0,01101	33,98500	-0,00143	32,97000	0,07335	32,59500	0,00417
35,17000	0,06040	34,77000	0,06174	33,67000	0,07024	33,32000	-0,00444
35,92000	0,58626	35,54500	0,70115	34,47000	0,06857	34,07000	-0,00209
36,72000	1,73848	36,32000	1,44027	35,17000	0,07562	34,82000	0,01007
37,47000	2,12006	37,09500	0,50877	35,87000	0,32688	35,52000	0,35894
38,25000	2,40082	37,86000	0,35995	36,67000	1,50087	36,27000	1,46749
39,12000	2,54230	38,68500	0,16262	37,42000	2,07080	37,04500	0,75991
39,87000	2,61094	39,49500	0,09151	38,12000	2,35117	37,77000	0,40052
40,62000	2,66404	40,24500	0,07080	38,92000	2,51462	38,52000	0,20431
41,42000	2,69504	41,02000	0,03875	39,67000	2,60525	39,29500	0,12084
42,20000	2,72193	41,81000	0,03447	40,42000	2,66567	40,04500	0,08057
43,02000	2,73870	42,61000	0,02045	41,12000	2,70568	40,77000	0,05716
43,82000	2,75540	43,42000	0,02088	41,87000	2,73845	41,49500	0,04370
44,57000	2,76557	44,19500	0,01356	42,57000	2,76012	42,22000	0,03095
45,42000	2,77629	44,99500	0,01261	43,37000	2,77871	42,97000	0,02324
46,17000	2,78283	45,79500	0,00872	44,04000	2,79249	43,70500	0,02056
46,97000	2,79107	46,57000	0,01030	44,92000	2,80951	44,48000	0,01935
47,72000	2,80007	47,34500	0,01201	45,67000	2,82138	45,29500	0,01582
48,47000	2,80792	48,09500	0,01046	46,37000	2,83009	46,02000	0,01245
49,27000	2,81482	48,87000	0,00863	47,02000	2,84148	46,69500	0,01751
50,07000	2,82439	49,67000	0,01196	47,87000	2,85158	47,44500	0,01188
50,77000	2,83032	50,42000	0,00847	48,62000	2,85924	48,24500	0,01021
51,57000	2,83416	51,17000	0,00480	49,22000	2,86802	48,92000	0,01464
52,37000	2,83573	51,97000	0,00196	50,02000	2,87822	49,62000	0,01276
53,22000	2,83181	52,79500	-0,00461	50,77000	2,88656	50,39500	0,01111
54,02000	2,82700	53,62000	-0,00601	51,57000	2,89270	51,17000	0,00768
54,67000	2,80115	54,34500	-0,03977	52,30000	2,89902	51,93500	0,00866
55,52000	2,75832	55,09500	-0,05038	53,07000	2,90657	52,68500	0,00980
56,32000	2,66002	55,92000	-0,12288	53,77000	2,91019	53,42000	0,00517
57,07000	2,47010	56,69500	-0,25323	54,57000	2,91616	54,17000	0,00746
57,87000	2,14695	57,47000	-0,40394	55,32000	2,92372	54,94500	0,01009
58,67000	1,68869	58,27000	-0,57282	56,02000	2,92811	55,67000	0,00627
59,42000	1,16577	59,04500	-0,69723	56,77000	2,93389	56,39500	0,00770
60,17000	0,80108	59,79500	-0,48625	57,52000	2,93604	57,14500	0,00286
				58,27000	2,94037	57,89500	0,00579
				59,02000	2,94166	58,64500	0,00172
				59,76000	2,94484	59,39000	0,00429



4.4 6,00-60,00°C Ramp 1				4.5 6,00-60,00°C Ramp 1			
Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada	Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada
6,02000	0,08657			6,30000	0,09009		
6,92000	0,08549	6,47000	-0,00120	7,32000	0,09006	6,81000	-0,00003
7,67000	0,09013	7,29500	0,00619	8,02000	0,08990	7,67000	-0,00023
8,42000	0,08779	8,04500	-0,00312	8,82000	0,08985	8,42000	-0,00007
9,23000	0,08446	8,82500	-0,00411	9,57000	0,09005	9,19500	0,00026
10,02000	0,08367	9,62500	-0,00100	10,32000	0,09019	9,94500	0,00019
10,82000	0,08471	10,42000	0,00130	11,22000	0,08956	10,77000	-0,00070
11,57000	0,08385	11,19500	-0,00115	11,97000	0,09042	11,59500	0,00115
12,37000	0,08391	11,97000	0,00008	12,70000	0,09032	12,33500	-0,00014
13,17000	0,08484	12,77000	0,00116	13,42000	0,08992	13,06000	-0,00055
13,97000	0,08395	13,57000	-0,00111	14,27000	0,09002	13,84500	0,00012
14,77000	0,08394	14,37000	-0,00001	15,12000	0,08937	14,69500	-0,00077
15,52000	0,08493	15,14500	0,00132	15,87000	0,08977	15,49500	0,00053
16,32000	0,08383	15,92000	-0,00137	16,66000	0,09008	16,26500	0,00040
17,17000	0,08427	16,74500	0,00051	17,42000	0,08988	17,04000	-0,00027
17,92000	0,08418	17,54500	-0,00012	18,27000	0,09052	17,84500	0,00076
18,72000	0,08507	18,32000	0,00111	19,01000	0,09033	18,64000	-0,00026
19,47000	0,08592	19,09500	0,00114	19,82000	0,09001	19,41500	-0,00039
20,22000	0,08511	19,84500	-0,00108	20,62000	0,09016	20,22000	0,00019
20,97000	0,08573	20,59500	0,00083	21,29000	0,09047	20,95500	0,00046
21,72000	0,08572	21,34500	-0,00002	22,12000	0,09120	21,70500	0,00088
22,57000	0,08592	22,14500	0,00024	22,87000	0,09132	22,49500	0,00015
23,22000	0,08566	22,89500	-0,00041	23,62000	0,09208	23,24500	0,00102
24,08000	0,08665	23,65000	0,00116	24,37000	0,09182	23,99500	-0,00036
24,87000	0,08625	24,47500	-0,00051	25,12000	0,09281	24,74500	0,00132
25,62000	0,08708	25,24500	0,00111	25,92000	0,09307	25,52000	0,00033
26,42000	0,08797	26,02000	0,00111	26,77000	0,09387	26,34500	0,00094
27,17000	0,08929	26,79500	0,00176	27,52000	0,09469	27,14500	0,00109
27,97000	0,08940	27,57000	0,00014	28,37000	0,09579	27,94500	0,00129
28,77000	0,09131	28,37000	0,00239	29,07000	0,09751	28,72000	0,00246
29,57000	0,09286	29,17000	0,00194	29,92000	0,09931	29,49500	0,00212
30,32000	0,09595	29,94500	0,00412	30,67000	0,10171	30,29500	0,00320
31,12000	0,09726	30,72000	0,00164	31,42000	0,10457	31,04500	0,00381
31,82000	0,09961	31,47000	0,00336	32,12000	0,10684	31,77000	0,00325
32,57000	0,10299	32,19500	0,00450	32,82000	0,11034	32,47000	0,00500
33,27000	0,10636	32,92000	0,00482	33,67000	0,11429	33,24500	0,00464
34,02000	0,11040	33,64500	0,00538	34,37000	0,11904	34,02000	0,00679
34,82000	0,11560	34,42000	0,00650	35,17000	0,12466	34,77000	0,00702
35,67000	0,12729	35,24500	0,01376	36,02000	0,57030	35,59500	0,52428
36,47000	2,12824	36,07000	2,50117	36,77000	2,54552	36,39500	2,63363
37,17000	2,75799	36,82000	0,89965	37,52000	2,85488	37,14500	0,41248
37,97000	2,92222	37,57000	0,20529	38,32000	2,96684	37,92000	0,13995
38,82000	2,98972	38,39500	0,07940	39,07000	3,02657	38,69500	0,07965
39,57000	3,02847	39,19500	0,05168	39,92000	3,06794	39,49500	0,04867
40,37000	3,05418	39,97000	0,03214	40,72000	3,08825	40,32000	0,02538
41,17000	3,07119	40,77000	0,02126	41,44000	3,10026	41,08000	0,01668
41,97000	3,08913	41,57000	0,02242	42,17000	3,11426	41,80500	0,01918
42,62000	3,09903	42,29500	0,01523	42,97000	3,11725	42,57000	0,00374
43,52000	3,10310	43,07000	0,00452	43,82000	3,11803	43,39500	0,00091
44,27000	3,10521	43,89500	0,00281	44,62000	3,11586	44,22000	-0,00271
45,02000	3,11249	44,64500	0,00971	45,42000	3,11287	45,02000	-0,00374
45,77000	3,10546	45,39500	-0,00938	46,12000	3,10032	45,77000	-0,01792
46,62000	3,10095	46,19500	-0,00531	46,97000	3,09897	46,54500	-0,00159
47,37000	3,09766	46,99500	-0,00439	47,62000	3,09194	47,29500	-0,01081
48,17000	3,09337	47,77000	-0,00536	48,47000	3,08585	48,04500	-0,00716
48,92000	3,09303	48,54500	-0,00045	49,22000	3,07595	48,84500	-0,01320
49,67000	3,08229	49,29500	-0,01432	49,97000	3,06237	49,59500	-0,01812
50,47000	3,07378	50,07000	-0,01064	50,82000	3,05147	50,39500	-0,01282
51,27000	3,05950	50,87000	-0,01784	51,52000	3,03806	51,17000	-0,01917
52,02000	3,05130	51,64500	-0,01094	52,34000	3,02589	51,93000	-0,01483
52,92000	3,03999	52,47000	-0,01256	53,17000	3,01626	52,75500	-0,01161
53,67000	3,03013	53,29500	-0,01315	53,97000	3,00386	53,57000	-0,01550
54,42000	3,02321	54,04500	-0,00922	54,77000	2,98962	54,37000	-0,01780
55,17000	3,00883	54,79500	-0,01918	55,62000	2,98306	55,19500	-0,00771
55,97000	2,99338	55,57000	-0,01931	56,37000	2,96696	55,99500	-0,02148
56,77000	2,97765	56,37000	-0,01967	57,15000	2,94696	56,76000	-0,02564
57,67000	2,97022	57,22000	-0,00826	57,97000	2,93515	57,56000	-0,01439
58,42000	2,96022	58,04500	-0,01333	58,67000	2,93248	58,32000	-0,00382
59,17000	2,94565	58,79500	-0,01943	59,47000	2,92672	59,07000	-0,00720
59,95000	2,93500	59,56000	-0,01365	60,27000	2,91453	59,87000	-0,01524



5.4 6,00-60,00°C Ramp 1				5.5 6,00-60,00°C Ramp 1			
Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada	Temperature (°C)	Abs	Tª media	Iª derivada
6,02000	0,07357			6,07000	0,08827		
6,88000	0,05232	6,45000	-0,02470	7,07000	0,08703	6,57000	-0,00124
7,57000	0,04584	7,22500	-0,00940	7,67000	0,08888	7,37000	0,00307
8,42000	0,04578	7,99500	-0,00007	8,57000	0,08927	8,12000	0,00044
9,20000	0,04585	8,81000	0,00010	9,32000	0,08898	8,94500	-0,00039
9,97000	0,04550	9,58500	-0,00046	10,12000	0,08761	9,72000	-0,00171
10,82000	0,04567	10,39500	0,00020	10,88000	0,08657	10,50000	-0,00137
11,57000	0,04500	11,19500	-0,00089	11,67000	0,08574	11,27500	-0,00106
12,32000	0,04466	11,94500	-0,00045	12,37000	0,08492	12,02000	-0,00117
13,12000	0,04369	12,72000	-0,00122	13,17000	0,08440	12,77000	-0,00064
13,79000	0,04446	13,45500	0,00116	13,87000	0,08434	13,52000	-0,00010
14,57000	0,04500	14,18000	0,00069	14,72000	0,08394	14,29500	-0,00047
15,37000	0,04406	14,97000	-0,00118	15,48000	0,08315	15,10000	-0,00104
16,07000	0,04389	15,72000	-0,00024	16,27000	0,08297	15,87500	-0,00022
16,87000	0,04366	16,47000	-0,00029	17,07000	0,08140	16,67000	-0,00196
17,67000	0,04364	17,27000	-0,00002	17,78000	0,08147	17,42500	0,00010
18,52000	0,04318	18,09500	-0,00054	18,62000	0,08036	18,20000	-0,00132
19,32000	0,04348	18,92000	0,00037	19,42000	0,08061	19,02000	0,00031
20,07000	0,04327	19,69500	-0,00027	20,14000	0,07979	19,78000	-0,00114
20,82000	0,04324	20,44500	-0,00004	20,92000	0,08091	20,53000	0,00143
21,62000	0,04343	21,22000	0,00024	21,77000	0,08052	21,34500	-0,00045
22,42000	0,04320	22,02000	-0,00028	22,57000	0,08122	22,17000	0,00087
23,27000	0,04304	22,84500	-0,00019	23,32000	0,08171	22,94500	0,00066
23,97000	0,04227	23,62000	-0,00110	24,12000	0,08344	23,72000	0,00216
24,77000	0,04360	24,37000	0,00166	24,82000	0,08521	24,47000	0,00252
25,62000	0,04361	25,19500	0,00002	25,77000	0,08748	25,29500	0,00239
26,31000	0,04325	25,96500	-0,00052	26,42000	0,09053	26,09500	0,00469
27,17000	0,04491	26,74000	0,00192	27,27000	0,09312	26,84500	0,00304
27,87000	0,04522	27,52000	0,00046	28,07000	0,09387	27,67000	0,00093
28,70000	0,04549	28,28500	0,00032	28,82000	0,09424	28,44500	0,00049
29,47000	0,04688	29,08500	0,00182	29,62000	0,09709	29,22000	0,00357
30,27000	0,04940	29,87000	0,00315	30,32000	0,10049	29,97000	0,00486
31,02000	0,05108	30,64500	0,00223	31,12000	0,10340	30,72000	0,00363
31,77000	0,05418	31,39500	0,00414	31,87000	0,10689	31,49500	0,00466
32,67000	0,05826	32,22000	0,00454	32,72000	0,11154	32,29500	0,00547
33,42000	0,06124	33,04500	0,00397	33,57000	0,11590	33,14500	0,00514
34,27000	0,06816	33,84500	0,00814	34,42000	0,12216	33,99500	0,00735
35,07000	0,25305	34,67000	0,23112	35,17000	0,26838	34,79500	0,19496
35,92000	2,20221	35,49500	2,29313	36,02000	2,21687	35,59500	2,29234
36,67000	2,67260	36,29500	0,62718	36,77000	2,66196	36,39500	0,59346
37,47000	2,83203	37,07000	0,19929	37,52000	2,79526	37,14500	0,17773
38,27000	2,92147	37,87000	0,11181	38,37000	2,86152	37,94500	0,07795
39,02000	2,98255	38,64500	0,08143	39,17000	2,91260	38,77000	0,06386
39,82000	3,01820	39,42000	0,04457	40,02000	2,96506	39,59500	0,06172
40,72000	3,04514	40,27000	0,02993	40,79000	3,00901	40,40500	0,05707
41,52000	3,05117	41,12000	0,00754	41,67000	3,04123	41,23000	0,03661
42,27000	3,07154	41,89500	0,02716	42,42000	3,06458	42,04500	0,03114
43,12000	3,07220	42,69500	0,00077	43,27000	3,09151	42,84500	0,03168
43,87000	3,06787	43,49500	-0,00577	44,02000	3,10211	43,64500	0,01414
44,70000	3,07031	44,28500	0,00294	44,87000	3,09931	44,44500	-0,00330
45,57000	3,06639	45,13500	-0,00451	45,62000	3,09993	45,24500	0,00083
46,37000	3,05996	45,97000	-0,00805	46,42000	3,09158	46,02000	-0,01044
47,07000	3,05862	46,72000	-0,00191	47,17000	3,08285	46,79500	-0,01163
47,77000	3,05159	47,42000	-0,01005	47,97000	3,07584	47,57000	-0,00877
48,52000	3,04432	48,14500	-0,00969	48,72000	3,06729	48,34500	-0,01140
49,27000	3,04161	48,89500	-0,00362	49,42000	3,06042	49,07000	-0,00981
50,07000	3,02772	49,67000	-0,01735	50,12000	3,04900	49,77000	-0,01632
50,77000	3,01553	50,42000	-0,01742	50,97000	3,03384	50,54500	-0,01784
51,62000	2,99945	51,19500	-0,01892	51,72000	3,02566	51,34500	-0,01090
52,37000	2,99020	51,99500	-0,01234	52,47000	3,01137	52,09500	-0,01906
53,07000	2,97026	52,72000	-0,02849	53,17000	2,99855	52,82000	-0,01832
53,92000	2,95800	53,49500	-0,01442	54,01000	2,97892	53,59000	-0,02336
54,67000	2,94141	54,29500	-0,02212	54,87000	2,96703	54,44000	-0,01383
55,52000	2,91984	55,09500	-0,02538	55,62000	2,95215	55,24500	-0,01984
56,22000	2,89899	55,87000	-0,02979	56,42000	2,93198	56,02000	-0,02522
57,12000	2,88582	56,67000	-0,01463	57,12000	2,91292	56,77000	-0,02722
57,87000	2,87039	57,49500	-0,02058	57,92000	2,90041	57,52000	-0,01564
58,60000	2,84523	58,23500	-0,03446	58,77000	2,88333	58,34500	-0,02010
59,32000	2,81722	58,96000	-0,03891	59,52000	2,86203	59,14500	-0,02840
60,17000	2,78789	59,74500	-0,03451	60,31000	2,83125	59,91500	-0,03897



ANÁLISIS 1				ANÁLISIS 2				ANÁLISIS 3			
Temperature (°C)	Abs	T° media	1° derivada	Temperature (°C)	Abs	T° media	1° derivada	Temperature (°C)	Abs	T° media	1° derivada
6,07000	0,09513			6,12000	0,05507			6,22000	0,07887		
7,17000	0,09639	6,62000	0,00114	7,27000	0,04783	6,69500	-0,00630	7,27000	0,07948	6,74500	0,00058
7,92000	0,09686	7,54500	0,00063	8,12000	0,04388	7,69500	-0,00464	8,27000	0,07934	7,77000	-0,00014
8,87000	0,09751	8,39500	0,00069	9,07000	0,04172	8,59500	-0,00228	9,10000	0,07925	8,68500	-0,00010
9,82000	0,09637	9,34500	-0,00121	9,87000	0,04148	9,47000	-0,00029	10,07000	0,07831	9,58500	-0,00097
10,62000	0,09549	10,22000	-0,00109	10,82000	0,04152	10,34500	0,00004	10,92000	0,07404	10,49500	-0,00503
11,57000	0,09492	11,09500	-0,00060	11,67000	0,04287	11,24500	0,00159	11,77000	0,07100	11,34500	-0,00358
12,47000	0,09455	12,02000	-0,00041	12,67000	0,04312	12,17000	0,00024	12,72000	0,06825	12,24500	-0,00289
13,37000	0,09566	12,92000	0,00123	13,42000	0,04356	13,04500	0,00059	13,62000	0,06452	13,17000	-0,00415
14,22000	0,09694	13,79500	0,00152	14,37000	0,04497	13,89500	0,00148	14,57000	0,06378	14,09500	-0,00078
15,12000	0,09954	14,67000	0,00289	15,37000	0,04623	14,87000	0,00126	15,37000	0,06898	14,97000	0,00650
16,02000	0,10196	15,57000	0,00269	16,12000	0,04760	15,74500	0,00182	16,27000	0,07062	15,82000	0,00183
16,97000	0,10407	16,49500	0,00222	17,12000	0,04831	16,62000	0,00072	17,27000	0,07198	16,77000	0,00135
17,92000	0,10315	17,44500	-0,00097	17,97000	0,05009	17,54500	0,00209	18,12000	0,07447	17,69500	0,00293
18,67000	0,10168	18,29500	-0,00195	18,87000	0,05156	18,42000	0,00163	19,02000	0,07572	18,57000	0,00139
19,62000	0,10393	19,14500	0,00236	19,77000	0,05274	19,32000	0,00132	19,87000	0,07595	19,44500	0,00027
20,47000	0,10493	20,04500	0,00118	20,72000	0,05257	20,24500	-0,00018	20,76000	0,07671	20,31500	0,00086
21,37000	0,10527	20,92000	0,00037	21,47000	0,05331	21,09500	0,00098	21,66000	0,07689	21,21000	0,00020
22,27000	0,10313	21,82000	-0,00238	22,43000	0,05404	21,95000	0,00076	22,58000	0,07856	22,12000	0,00181
23,27000	0,10177	22,77000	-0,00136	23,37000	0,05576	22,90000	0,00183	23,52000	0,07901	23,05000	0,00048
24,12000	0,10112	23,69500	-0,00076	24,32000	0,05572	23,84500	-0,00003	24,37000	0,07921	23,94500	0,00023
25,07000	0,10189	24,59500	0,00081	25,17000	0,05650	24,74500	0,00091	25,27000	0,08077	24,82000	0,00174
25,87000	0,10206	25,47000	0,00021	25,97000	0,05822	25,57000	0,00215	26,12000	0,08130	25,69500	0,00062
26,82000	0,10401	26,34500	0,00206	26,97000	0,05953	26,47000	0,00131	27,07000	0,08273	26,59500	0,00151
27,67000	0,10473	27,24500	0,00085	27,82000	0,06035	27,39500	0,00096	28,07000	0,08357	27,57000	0,00084
28,62000	0,10560	28,14500	0,00092	28,72000	0,06213	28,27000	0,00199	28,87000	0,08556	28,47000	0,00248
29,52000	0,10716	29,07000	0,00173	29,62000	0,06398	29,17000	0,00205	29,72000	0,08649	29,29500	0,00109
30,37000	0,11063	29,94500	0,00408	30,57000	0,06530	30,09500	0,00139	30,72000	0,08926	30,22000	0,00277
31,37000	0,11198	30,87000	0,00135	31,42000	0,06705	30,99500	0,00206	31,54000	0,09049	31,13000	0,00150
32,17000	0,11379	31,77000	0,00227	32,30000	0,07032	31,86000	0,00372	32,44000	0,09250	31,99000	0,00223
33,07000	0,11630	32,62000	0,00278	33,18000	0,07349	32,74000	0,00360	33,42000	0,09573	32,93000	0,00330
34,02000	0,12547	33,54500	0,00966	34,17000	0,07856	33,67500	0,00512	34,27000	0,10286	33,84500	0,00838
34,87000	0,15395	34,44500	0,03351	34,92000	0,10565	34,54500	0,03612	35,22000	0,18021	34,74500	0,08142
35,77000	2,22463	35,32000	2,30075	35,92000	2,17156	35,42000	2,06591	36,02000	2,48563	35,62000	2,88178
36,72000	2,77982	36,24500	0,58441	36,92000	2,81635	36,42000	0,64478	37,02000	2,89162	36,52000	0,40599
37,62000	2,91620	37,17000	0,15153	37,67000	2,94733	37,29500	0,17464	37,82000	3,01291	37,42000	0,15162
38,47000	2,97745	38,04500	0,07206	38,62000	3,00290	38,14500	0,05850	38,77000	3,05705	38,29500	0,04646
39,37000	3,01550	38,92000	0,04228	39,52000	3,03970	39,07000	0,04089	39,67000	3,09444	39,22000	0,04155
40,32000	3,04164	39,84500	0,02752	40,52000	3,05434	40,02000	0,01463	40,57000	3,11200	40,12000	0,01950
41,22000	3,06496	40,77000	0,02591	41,32000	3,06315	40,92000	0,01102	41,42000	3,11296	40,99500	0,00114
42,07000	3,06552	41,64500	0,00066	42,17000	3,05946	41,74500	-0,00435	42,30000	3,12261	41,86000	0,01096
42,87000	3,06670	42,47000	0,00148	43,07000	3,04620	42,62000	-0,01473	43,20000	3,10906	42,75000	-0,01505
43,82000	3,05464	43,34500	-0,01270	44,07000	3,02208	43,57000	-0,02412	44,11000	3,08949	43,65500	-0,02151
44,67000	3,03477	44,24500	-0,02337	44,86000	2,99166	44,46500	-0,03851	44,97000	3,06085	44,54000	-0,03330
45,63000	3,00727	45,15000	-0,02865	45,78000	2,95247	45,32000	-0,04260	45,92000	3,02313	45,44500	-0,03971
46,54000	2,97965	46,08500	-0,03035	46,72000	2,91680	46,25000	-0,03795	46,87000	2,99083	46,39500	-0,03400
47,41000	2,95091	46,97500	-0,03303	47,57000	2,89645	47,14500	-0,02395	47,72000	2,96575	47,29500	-0,02951
48,27000	2,93765	47,84000	-0,01542	48,52000	2,86860	48,04500	-0,02931	48,67000	2,94522	48,19500	-0,02161
49,32000	2,92095	48,79500	-0,01591	49,37000	2,84611	48,94500	-0,02645	49,52000	2,92945	49,09500	-0,01855
50,12000	2,91125	49,72000	-0,01212	50,27000	2,83679	49,82000	-0,01036	50,42000	2,91645	49,97000	-0,01444
50,97000	2,89903	50,54500	-0,01438	51,17000	2,81806	50,72000	-0,02081	51,32000	2,90405	50,87000	-0,01377
51,87000	2,88677	51,42000	-0,01362	52,07000	2,81042	51,62000	-0,00849	52,22000	2,88915	51,77000	-0,01656
52,87000	2,87535	52,37000	-0,01142	53,07000	2,79406	52,57000	-0,01635	53,12000	2,88576	52,67000	-0,00377
53,77000	2,87041	53,32000	-0,00548	53,92000	2,79370	53,49500	-0,00043	53,97000	2,87033	53,54500	-0,01814
54,67000	2,85649	54,22000	-0,01547	54,87000	2,79228	54,39500	-0,00149	54,92000	2,87013	54,44500	-0,00021
55,57000	2,84054	55,12000	-0,01772	55,60000	2,77287	55,23500	-0,02659	55,82000	2,85961	55,37000	-0,01169
56,47000	2,83882	56,02000	-0,00191	56,52000	2,75318	56,06000	-0,02140	56,77000	2,84683	56,29500	-0,01345
57,28000	2,83537	56,87500	-0,00426	57,40000	2,75080	56,96000	-0,00271	57,57000	2,82892	57,17000	-0,02239
58,17000	2,82572	57,72500	-0,01084	58,37000	2,75252	57,88500	0,00177	58,57000	2,81690	58,07000	-0,01202
59,12000	2,79228	58,64500	-0,03520	59,27000	2,74178	58,82000	-0,01193	59,37000	2,81313	58,97000	-0,00470
60,02000	2,75370	59,57000	-0,04287	60,17000	2,72983	59,72000	-0,01328	60,27000	2,79777	59,82000	-0,01707

ANÁLISIS 4				ANÁLISIS 5			
Temperature (°C)	Abs	Tª media	1ª derivada	Temperature (°C)	Abs	Tª media	1ª derivada
6,52000	0,04997			6,63000	0,06832		
7,44000	0,05096	6,98000	0,00107	7,57000	0,06169	7,10000	-0,00705
8,34000	0,04940	7,89000	-0,00173	8,52000	0,06071	8,04500	-0,00103
9,24000	0,04875	8,79000	-0,00073	9,37000	0,06001	8,94500	-0,00083
10,12000	0,04915	9,68000	0,00045	10,32000	0,05978	9,84500	-0,00024
11,02000	0,04919	10,57000	0,00005	11,22000	0,06032	10,77000	0,00060
11,87000	0,04976	11,44500	0,00067	12,07000	0,06240	11,64500	0,00244
12,92000	0,05076	12,39500	0,00096	12,97000	0,06237	12,52000	-0,00003
13,72000	0,05176	13,32000	0,00124	13,82000	0,06323	13,39500	0,00101
14,67000	0,05208	14,19500	0,00034	14,77000	0,06370	14,29500	0,00050
15,57000	0,05295	15,12000	0,00097	15,72000	0,06393	15,24500	0,00024
16,37000	0,05481	15,97000	0,00232	16,52000	0,06731	16,12000	0,00423
17,37000	0,05576	16,87000	0,00095	17,52000	0,06674	17,02000	-0,00057
18,32000	0,05652	17,84500	0,00080	18,34000	0,06847	17,93000	0,00211
19,10000	0,05791	18,71000	0,00179	19,22000	0,07099	18,78000	0,00286
20	0,05978	19,10000	0,00207	20,12000	0,07106	19,67000	0,00008
21,02000	0,05942	21,02000	-0,00035	21,12000	0,07257	20,62000	0,00151
21,77000	0,06039	21,39500	0,00130	21,97000	0,07491	21,54500	0,00276
22,72000	0,05993	22,24500	-0,00049	22,92000	0,07361	22,44500	-0,00137
23,67000	0,06124	23,19500	0,00137	23,82000	0,07388	23,37000	0,00030
24,47000	0,06187	24,07000	0,00080	24,67000	0,07597	24,24500	0,00245
25,42000	0,06239	24,94500	0,00054	25,47000	0,07772	25,07000	0,00219
26,22000	0,06275	25,82000	0,00045	26,42000	0,07773	25,94500	0,00001
27,22000	0,06397	26,72000	0,00123	27,37000	0,07851	26,89500	0,00082
28,17000	0,06495	27,69500	0,00103	28,22000	0,08180	27,79500	0,00388
29,07000	0,06522	28,62000	0,00029	29,12000	0,08091	28,67000	-0,00099
29,92000	0,06708	29,49500	0,00219	30,02000	0,08417	29,57000	0,00362
30,77000	0,06888	30,34500	0,00212	30,97000	0,08759	30,49500	0,00360
31,66000	0,07060	31,21500	0,00193	31,77000	0,09043	31,37000	0,00355
32,62000	0,07321	32,14000	0,00272	32,77000	0,09395	32,27000	0,00353
33,47000	0,07703	33,04500	0,00450	33,67000	0,10022	33,22000	0,00696
34,42000	0,08256	33,94500	0,00582	34,52000	0,10954	34,09500	0,01097
35,22000	0,41380	34,82000	0,41405	35,32000	0,93945	34,92000	1,03739
36,17000	2,63145	35,69500	2,33437	36,32000	2,73078	35,82000	1,79133
37,07000	2,88629	36,62000	0,28316	37,27000	2,92687	36,79500	0,20640
37,97000	2,97140	37,52000	0,09457	38,09000	2,99588	37,68000	0,08416
38,82000	3,01076	38,39500	0,04630	38,99000	3,03596	38,54000	0,04453
39,77000	3,03582	39,29500	0,02638	39,92000	3,05857	39,45500	0,02431
40,62000	3,04882	40,19500	0,01529	40,87000	3,06977	40,39500	0,01179
41,57000	3,04620	41,09500	-0,00276	41,77000	3,06785	41,32000	-0,00214
42,43000	3,03894	42,00000	-0,00844	42,52000	3,06114	42,14500	-0,00894
43,27000	3,02286	42,85000	-0,01914	43,47000	3,04286	42,99500	-0,01924
44,32000	2,99108	43,79500	-0,03027	44,42000	3,02144	43,94500	-0,02255
45,17000	2,95496	44,74500	-0,04249	45,22000	2,98927	44,82000	-0,04021
46,07000	2,91576	45,62000	-0,04356	46,22000	2,96117	45,72000	-0,02810
46,97000	2,88947	46,52000	-0,02922	47,12000	2,93170	46,67000	-0,03275
47,82000	2,87113	47,39500	-0,02157	47,92000	2,92016	47,52000	-0,01442
48,77000	2,85904	48,29500	-0,01273	48,82000	2,90977	48,37000	-0,01154
49,62000	2,84547	49,19500	-0,01597	49,77000	2,89359	49,29500	-0,01704
50,52000	2,82652	50,07000	-0,02105	50,57000	2,87989	50,17000	-0,01713
51,42000	2,80489	50,97000	-0,02403	51,62000	2,86492	51,09500	-0,01426
52,27000	2,80887	51,84500	0,00468	52,42000	2,84976	52,02000	-0,01894
53,22000	2,79382	52,74500	-0,01584	53,37000	2,84768	52,89500	-0,00219
54,17000	2,77218	53,69500	-0,02278	54,27000	2,83738	53,82000	-0,01144
55,12000	2,77830	54,64500	0,00644	55,17000	2,82798	54,72000	-0,01045
55,87000	2,76476	55,49500	-0,01806	56,02000	2,82704	55,59500	-0,00110
56,82000	2,75443	56,34500	-0,01087	56,97000	2,81788	56,49500	-0,00964
57,67000	2,75126	57,24500	-0,00373	57,87000	2,78760	57,42000	-0,03364
58,62000	2,75470	58,14500	0,00362	58,77000	2,76329	58,32000	-0,02702
59,57000	2,74806	59,09500	-0,00699	59,72000	2,75811	59,24500	-0,00545
60,37000	2,72001	59,97000	-0,03507	60,52000	2,75299	60,12000	-0,00640

