



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

Grado en Ingeniería Química

**Electrohilado de nanofibras
fotosensibles a partir de
biopolímeros tipo elastina**

Autor:

Muñoz Noriega, Jesús

Tutores:

**Santos García, Mercedes
Testera Gorgojo, Ana María
Departamento Química Orgánica**

Valladolid, Junio 2015.

AGRADECIMIENTOS

Solamente expresar mi completo agradecimiento a todos y cada uno de los compañeros del grupo BIOFORGE, con los que he trabajado muy cómodo, y que me han ayudado y enseñado, siempre con una sonrisa en la cara. Destacar a mi tutora, Merche, por su calidad humana y profesional, con quien ha sido un placer encontrarme en el camino.

Agradecer estos 5 años a mis amigos, con los que he compartido mucho, y que han hecho más fácil y agradable este período de mi vida, *Raquel, Marta, Jorge, Álvaro, Sheila, Noelia, María, Ana y Alejandro.*

Por último, dar las gracias y dedicar este proyecto, muy especialmente, a mis padres *Jesús y Rosa*, y a mis hermanos *Rubén e Irene*, porque sois imprescindibles en cada paso que doy y admiro que sepáis levantarme cuando me caigo. Sin vosotros, nada.

***RESUMEN Y PALABRAS
CLAVE***

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El presente trabajo consiste en la preparación de superficies recubiertas de nanofibras fotosensibles y monocomponentes, a partir de recombinámeros tipo elastina (ELRs), un material biocompatible, biodegradable, bioactivo, con un comportamiento termosensible y capacidad de autoensamblado, diseñado mediante ingeniería genética.

Los ELRs son bioproducidos por crecimiento y fermentación de la bacteria *Escherichia coli* y modificados químicamente como fenil azidas que aportan el carácter fotosensible al polímero.

La técnica de electrohilado es utilizada para la producción de nanofibras monocomponente sobre superficies, imitando la elastina de la matriz extracelular. El entrecruzamiento de las fibras se obtiene fotoquímicamente, mediante irradiación con luz UV, por reacción entre los grupos fenil azido, lo que genera grupos fenilazobenceno fotosensibles que hacen insoluble al material.

Las estructuras fibrosas formadas tienen potenciales aplicaciones en campos como la ingeniería de tejidos debido a su citocompatibilidad.

Palabras clave: recombinámeros tipo elastina, fotosensibilidad, fenilazida, electrohilado, nanofibras.

ABSTRACT

This project involves preparing photosensitive nanofibers coated surfaces from elastin like recombinamers (ELRs). This is a genetically engineered material and it is characterized by being biocompatible, biodegradable, bioactive, with a thermo sensitive behavior and the ability of self-assembly.

The ELRs are bioproduced for growth and bacterium *Escherichia coli* fermentation, and chemically modified with phenyl azides which provide the photosensitive character to polymers.

The electrospinning technique is used for producing monocomponent nanofiber surfaces, mimicking the elastin of extracellular matrix. The fibers crosslinking is photochemically obtained by irradiation with UV light. In this process, phenyl azides react to form the azobenzene groups, which are photosensitive and insoluble in water.

The fibers structure formed has potential applications in fields such as tissue engineering due to their cytocompatibility with cells.

Keywords: elastin like recombinamers, photosensitivity, phenyl azide, electrospinning, nanofibers.

ÍNDICE

2. ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	5
2. ÍNDICE.....	9
3. OBJETIVOS	15
4. INTRODUCCIÓN.....	19
4.1 BIOMATERIALES	19
4.1.1 <i>Definición</i>	20
4.1.2 <i>Aplicaciones de los biomateriales</i>	21
4.2 BIOPOLÍMEROS TIPO ELASTINA.....	23
4.2.1 <i>Definición y características fundamentales (ELPs)</i>	24
4.2.2 <i>Aplicaciones de los polímeros tipo Elastina</i>	26
4.3 HIDROGELES	27
4.3.1 <i>Definición y características</i>	27
4.3.2 <i>Hidrogeles Fotosensibles</i>	29
4.3.3 <i>Aplicaciones de los hidrogeles</i>	32
4.4 ELECTROHILADO.....	33
4.4.1 <i>Historia electrohilado</i>	33
4.4.2 <i>Descripción, características</i>	34
4.4.3 <i>Parámetros generales</i>	36
4.4.3.1 <i>Parámetros del polímero</i>	36
4.4.3.2 <i>Parámetros de la disolución</i>	37
4.4.3.3 <i>Parámetros del proceso</i>	40
4.4.3.4 <i>Parámetros de laboratorio o ambientales</i>	41
4.4.4 <i>Aplicaciones del Electrohilado</i>	41
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	47
5.1 MATERIALES DE LABORATORIO	47
5.1.1 <i>Materiales y equipos</i>	47
5.1.2 <i>Reactivos y Disolventes</i>	47
5.1.3 <i>Biopolímero VKV₄</i>	49
5.1.4 <i>Medios de cultivo</i>	49
5.2 TÉCNICAS Y MÉTODOS INSTRUMENTALES	50
5.2.1 <i>Bioproducción y Purificación de ELRs</i>	50
5.2.1.1 <i>Introducción</i>	50
5.2.1.2 <i>Siembra de la placa</i>	50
5.2.1.3 <i>Preparación del inóculo</i>	51
5.2.1.4 <i>Crecimiento del inóculo</i>	52
5.2.1.5 <i>Producción bacteriana</i>	53
5.2.1.6 <i>Lavado de células</i>	55
5.2.1.7 <i>Extracción y purificación de recombinámeros tipo elastina, ELRs</i>	55
5.2.2 <i>Modificación química y purificación de ELRs</i>	58
5.2.2.1 <i>Protocolo modificación del biopolímero VKV₄ con fenil azidas</i>	58
5.2.2.2 <i>Protocolo modificación del biopolímero VKV₄ con azidas</i>	60
5.2.2.3 <i>Protocolo modificación del biopolímero VKV₄ con ciclooctino</i>	61

5.2.3 Caracterización de ELRs: bioproducidos y modificados químicamente	62
5.2.3.1 Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)	62
5.2.3.2 Resonancia Magnética Nuclear	64
5.2.3.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	65
5.2.3.4 MALDI-ToF	67
5.2.3.5 Espectroscopía UV-Vis	68
5.2.4 Electrohilado: síntesis de nanofibras	69
5.2.4.1 Descripción del equipo.....	69
5.2.4.2 Preparación de la muestra y del equipo	72
5.2.4.3 Determinación de variables y parámetros.....	73
5.2.4.4 Experimentación: Producción de microfibras y nanofibras	73
5.2.5 Entrecruzamiento del polímero fotosensible.....	75
5.2.5.1 Preparación de la muestra.....	75
5.2.5.2 Irradiación con luz UV-Vis.....	75
5.2.6 Caracterización de nanofibras.....	77
5.2.6.1 Microscopía óptica.....	77
5.2.6.2 Test del agua.....	78
5.2.6.3 Cultivo celular	78
5.2.6.4 Ángulo de contacto	80
5.2.6.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	81
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
6.1 BIOPRODUCCIÓN	85
6.2 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE POLÍMEROS TIPO ELASTINA	89
6.3 CARACTERIZACIÓN ELR _s QUÍMICAMENTE MODIFICADOS	90
6.4 SÍNTESIS DE HIDROGELES.....	93
6.5 OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS Y CARACTERIZACIÓN	95
6.5.1 Electrohilado: Optimización de la técnica.....	95
6.5.1.1 Optimización de las variables en “vertical”	95
6.5.1.2 Optimización de las variables en “horizontal”	99
6.5.2 Electrohilado de fibras fotosensibles.....	100
6.5.2.1 Ensayos Iniciales: Optimización de variables	100
6.5.2.2 Producción de fibras fotosensibles a partir del recombinámero modificado VKV ₄ -PH-N ₃	102
6.5.3 Entrecruzamiento de fibras fotosensibles.....	107
6.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	111
6.5.5 Medida Ángulo de contacto	113
6.5.6 Ensayos Celulares.....	114
7. ESTUDIO ECONÓMICO	125
7.1 COSTE DEL MATERIAL.....	125
7.2 COSTE DE REACTIVOS.....	127
7.3 COSTE DE LOS EQUIPOS.....	127
7.4 COSTE DEL PERSONAL.....	129
7.5 COSTE DE LA INSTALACIÓN	129
7.6 COSTE INDIRECTOS DE SERVICIOS	129
7.7 COSTES TOTALES.....	130

8. ESTUDIO DE SEGURIDAD.....	133
8.1 INTRODUCCIÓN	133
8.2 ORGANIZACIÓN Y RECOMENDACIONES GENERALES	135
8.3 ACTUACIÓN EN CASOS DE EMERGENCIA.....	139
8.4 PREVENCIÓN EN EL LABORATORIO: MATERIAL Y EQUIPOS.....	141
8.5 PREVENCIÓN EN EL LABORATORIO: OPERACIONES BÁSICAS	148
8.6 PREVENCIÓN EN EL LABORATORIO: REACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS	151
8.7 CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO DE SUSTANCIAS PELIGROSAS	152
8.8 ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS.....	154
8.9 EXTRACCIÓN LOCALIZADA EN EL LABORATORIO	155
8.10 PREVENCIÓN DEL RIESGO EN EL LABORATORIO: ELEMENTOS DE PROTECCIÓN Y ACTUACIÓN EN CASOS DE EMERGENCIA.....	157
8.11 EQUIPOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL.....	161
9. CONCLUSIONES	165
10. BIBLIOGRAFÍA	169
11. SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS.....	177
11.1 ABREVIATURAS	177
11.2 CÓDIGO AMINOÁCIDOS	178
12. ANEXOS.....	181
ANEXO I. CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS.....	181
ANEXO II. PELIGROSIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS	184

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado consiste en una parte de la investigación desarrollada por el grupo Bioforge, en la que se incluye el diseño, la bioproducción y la aplicación de polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs) como materiales altamente biocompatibles de aplicación en áreas como Biomedicina, Medicina Regenerativa o Nanotecnología.

El objetivo principal del TFG se centra en la producción y optimización, mediante la técnica de electrohilado, de un entramado de nanofibras entrecruzadas químicamente, a partir de un sistema monocomponente, a diferencia de lo que se había realizado anteriormente, buscando imitar el modelo y comportamiento de la matriz extracelular, formada por fibras de elastina insolubles. Debido a la modificación química con grupos fenil azido, el entrecruzamiento químico de las fibras se produce simplemente por irradiación con luz UV, dando lugar a grupos azobenceno que forman la red de fibras insolubles.

El cultivo de células permite evaluar la citocompatibilidad de la red de fibras poliméricas producida así como el comportamiento y la capacidad de respuesta simulando las condiciones de la matriz extracelular.

Estas superficies recubiertas de nanofibras poseen potenciales aplicaciones en el campo de la Ingeniería de tejidos impulsadas por la biocompatibilidad y el carácter termosensible y fotosensible del producto utilizado.

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

4.1 BIOMATERIALES

Desde hace miles de años los humanos han utilizado materiales para la reparación de partes del cuerpo. Los antiguos egipcios utilizaban hilos de lino para cerrar heridas hace 4000 años, mientras que los europeos utilizaban hilos de sutura en la Edad Media. Aunque la utilización de materiales para reparar el cuerpo antes de la medicina de la era moderna, no se limitaba solo a las suturas. Los cirujanos Incas generalmente reparaban fracturas de cráneo con placas de oro, y los antiguos Mayas usaban las caracolas para fabricar dientes artificiales, ver **Figura 4.1** [1].

En el siglo XX comienza a trabajarse con aceros inoxidable, como material resistente a la corrosión y adecuado para dispositivos ortopédicos. Sin embargo, la llegada de los polímeros sintéticos al final del siglo XIX, ha representado el crecimiento de una nueva ciencia, en la que rápidamente se impusieron estos nuevos materiales industriales que poseían ciertas características biológicas muy adecuadas [1, 2]. Por ejemplo, el polimetilmetacrilato, acetato de celulosa han podido ser empleados, sin necesidad de ser substancialmente rediseñados, para usos médicos en tubos de diálisis, injertos vasculares, corazones artificiales, odontología, etc.



Figura 4.1 Fenicios, etruscos, chinos y aztecas empleaban el oro en cirugía dental hace más de 2000 años. a) dientes de madera unidos por alambre de oro (romanos), b) prótesis dental fenicia (500 a.C), c) prótesis dental etrusca (300 a.C).

No obstante, la mayoría de los intentos de usar materiales en el cuerpo fueron más bien al azar. Solamente durante el último siglo y medio los físicos y científicos empezaron a examinar sistemáticamente las interacciones entre el cuerpo y los materiales [1].

A finales del siglo XIX y principios del siglo XX, se comenzó a explorar y estudiar las formas en las que el cuerpo reaccionaba ante los materiales implantados. La principal conclusión de esos estudios fue que el cuerpo no toleraba bien los materiales extraños. A partir de la Segunda Guerra Mundial estudios formales y observaciones más informales revelaron la existencia de

ciertos materiales que sí eran tolerados por el cuerpo. Los científicos más innovadores rápidamente reconocieron el potencial de utilizar materiales artificiales para tratar una gran variedad de problemas, desatando el gran campo de biomateriales tal como lo conocemos hoy día [1].

En la actualidad, más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes, siendo relativamente frecuente que conozcamos algún caso de alguien que esté utilizando algún dispositivo biomédico.

Utilizar biomateriales para reconstruir partes dañadas del cuerpo humano es una realidad, y para ello deben cumplir una serie de condiciones y asegurar una determinada duración. Por otra parte, tienen que aportar las prestaciones específicas que requiera la aplicación a la que vayan a ser destinados. Hace poco tiempo, los biomateriales eran, esencialmente, materiales industriales seleccionados con el criterio de que fueran capaces de cumplir ciertos requisitos de aceptabilidad biológica. Sin embargo, en la actualidad, muchos de ellos son diseñados, sintetizados y procesados con el fin de tener una aplicación en el campo médico.

Todos estos factores han impulsado un gran avance en el campo de los biomateriales potenciando su investigación. Si a esto se le añade la mejora de las técnicas quirúrgicas, se puede entender el crecimiento acelerado en la utilización de prótesis, implantes y sistemas y dispositivos médicos que deben trabajar en contacto con los tejidos corporales [3].

4.1.1 Definición

Las más recientes definiciones describen los biomateriales como sustancias, que no son nutrientes o fármacos, y que están incluidos en sistemas terapéuticos o diagnósticos, o como componentes de origen biológico que no se relacionan con sus aplicaciones. La medicina y la cirugía requieren de manera creciente de materiales ajenos al organismo con la finalidad de encontrar un remedio, definitivo o temporal, al déficit de una función fisiológica. Los biomateriales no son exclusivamente los dispositivos destinados a ser implantados en el cuerpo humano sino también los que están en contacto con las mucosas, o destinados a tratar la sangre incluyendo los sistemas que permiten la liberación controlada de fármacos[2].

Tales materiales poseen la capacidad de sustituir total o parcialmente las funciones de un organismo vivo y, por lo tanto, deben cumplir el requisito fundamental de la biocompatibilidad [3], es decir, no interactuar de forma perjudicial con el organismo. El grado de biocompatibilidad de un material es

función de su forma, estructura, composición química, y de sus propiedades físicas, mecánicas, químicas y eléctricas. Además, el grado de biocompatibilidad depende de la localización en el organismo y del tipo de aplicación. Otro requisito muy importante de un biomaterial es su duración, es decir la capacidad de mantener sus prestaciones exactamente durante el tiempo necesario, ya sea en un implante provisional o definitivo [2].

En la actualidad se dispone de una variedad de materiales que realizan satisfactoriamente las funciones biológicas en el cuerpo y los médicos pueden usarlos con razonable confianza, y la función en los pacientes es aceptable. Las complicaciones generadas por los dispositivos biomédicos, de existir, son menores que las que surgen de las enfermedades originales. Estos materiales pueden ser divididos en materiales metálicos, poliméricos, cerámicos y materiales compuestos.

Los biomateriales poliméricos, ampliamente utilizados, deben su éxito a las enormes posibilidades que presentan, tanto en variedad de compuestos como en la posibilidad de fabricarlos de muy distintas formas con características bien determinadas y con facilidad de conformarlos en fibras, tejidos, películas o bloques. Pueden ser tanto naturales como sintéticos y, en cualquier caso, se pueden encontrar formulaciones bioestables, con carácter permanente y particularmente útiles para sustituir de forma parcial o total tejidos u órganos lesionados o destruidos, o biodegradables, con carácter temporal y con una funcionalidad adecuada durante un tiempo limitado, el necesario mientras el problema subsista [3].

4.1.2 Aplicaciones de los biomateriales

Existen aplicaciones de polímeros tanto en implantes quirúrgicos como en membranas protectoras o en sistemas de dosificación de fármacos. Tienen particular importancia los cementos óseos acrílicos que han encontrado importantes campos de aplicación, en particular, en odontología y traumatología, dadas las ventajas que presentan frente a otros cementos, como son su fácil aplicación y su rápida polimerización. Sin embargo, por desgracia, presentan desventajas, tales como el calor que se desprende durante la polimerización que conduce en muchos casos a problemas de toxicidad y a la contracción que sufre una vez endurecido, lo que origina movilidad de la prótesis fijada. Sin embargo, pese a estos problemas, su utilización hoy por hoy es, prácticamente, insustituible [3].

Los polímeros han sido ampliamente utilizados en medicina y biotecnología [4] como dispositivos quirúrgicos [5], implantes [6], sistemas de administración de fármacos, portadores de enzimas y células inmovilizadas [7], biosensores, bioadhesivos, dispositivos oculares [8], materiales dentales

[9], de modificación de superficie [10], biosensores [11], componentes de las pruebas de diagnóstico [12], adhesivos tisulares [13] y materiales para aplicaciones de ingeniería de tejidos y ortopedia [14]. Esta versatilidad requiere la producción de polímeros preparados en diferentes estructuras, composiciones y adecuadas propiedades fisicoquímicas, interfaciales y biomiméticas para satisfacer las aplicaciones específicas. Las principales ventajas de los biomateriales poliméricos en comparación con los materiales metálicos o cerámicos radican en la facilidad de fabricación para producirlos en diferentes formas, tales como membranas, películas, fibras, geles, sábanas, hidrogeles, cápsulas, esferas, partículas y estructuras-3D (andamios) (**Figura 4.2**) y la facilidad de biodegradabilidad, precio razonable y la disponibilidad con propiedades mecánicas y físicas deseadas [15].

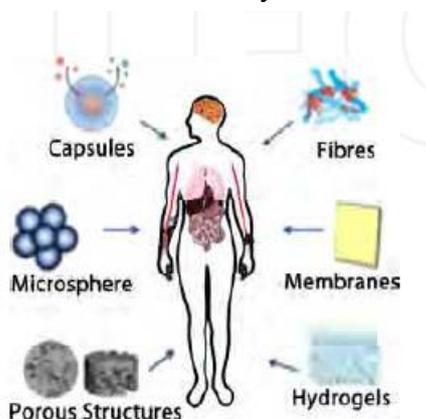


Figura 4.2 Biopolímeros utilizados en aplicaciones biomédicas tales como regeneración de tejidos y sistemas de liberación de fármacos.

Las propiedades requeridas de biomateriales poliméricos se recogen en la **Tabla 4.1**.

Propiedad	Descripción
Biocompatibilidad	No carcinogénesis, no pirogenicidad, no toxicidad, no alérgica
Biodegradabilidad	Fácil procesabilidad
Esterilizabilidad	Autoclave, calor seco, gas de óxido de etileno, radiación
Propiedades mecánicas y físicas	Fuerza, resistencia, elasticidad, durabilidad
Fabricación	Producción por moldeado, extrusión, formación de fibras, laboreo.

Tabla 4.1 Propiedades requeridas en biomateriales poliméricos.

Los diversos materiales poliméricos y sus aplicaciones biomédicas también se presentan en la **Tabla 4.2**. En aplicaciones biomédicas los principales polímeros derivan de fuentes orgánicas naturales o sintéticas.

En los últimos años, los avances de las tecnologías innovadoras en ingeniería de tejidos, sistemas de medicina regenerativa, terapia génica y administración de fármacos han promovido la necesidad de nuevos biomateriales biodegradables [15].

POLÍMERO	APLICACIONES DESTACADAS
Ácido poliglicólico (PGA)	Saturas y placas biodegradables, placas y clavos intra-medulares.
Ácido poliláctico (PLA)	Placas y clavos intra-medulares, placas de fracturas biodegradables, liberación controlada de fármacos, etc.
Copolímeros Butadieno-Estireno (BS)	Dispositivos de un solo uso, embalajes.
Copolímeros Estireno-Acrilonitrilo(SAN)	Componentes de hemodiálisis, aspiradores de sangre.
Poliacrilonitrilo (PAN)	Membranas de hemodiálisis.
Policarbonato (PC)	Membranas de oxigenadores y hemodiálisis.
Polietileno (PE, LDPE)	Films, embalajes, catéteres, tubos de conexión, liberación controlada de fármacos.
Politereftalato de etileno (PET)	Prótesis vasculares, anillos de sutura, suturas, etc.
Polimetilmetacrilato (PMMA)	Cemento óseo, membranas de hemodiálisis, lentes de contacto e intraoculares, material dentario.
Polipropileno (PP)	Embalajes estériles, jeringas, conectores, membranas de oxigenadores, hilos de sutura, asas de soporte, etc.
Politetrafluoroetileno (PTFE)	Prótesis vascular, componentes de válvulas, revestimientos, ligamentos artificiales, etc.
Poliuretano (PURs)	Catéteres, cánulas, tubos endotraqueales, prótesis valvulares, dispositivos de asistencia cardiaca, bolsas ventriculares, revestimientos hemocompatibles, etc.
Cloruro de polivinilideno (PVC)	Bolsas para la sangre, tubos endotraqueales, guantes, catéteres, dispositivos de un solo uso.
Siliconas	Catéteres, drenajes, membranas, piel artificial, implantes de cirugía plástica, prótesis vasculares y traqueales, revestimientos, infusorios, componentes de válvulas.

Tabla 4.2 Materiales poliméricos en el campo médico y sus las aplicaciones [2].

4.2 BIOPOLÍMEROS TIPO ELASTINA

La elastina natural consiste en una proteína estructural elástica e insoluble del tejido conjuntivo. Se encuentra presente en las zonas donde se requiere elasticidad y resiliencia tales como arterias, ligamentos, tendones, pulmones, piel y cartílago elástico [16].

La elastina posee varias características extraordinarias, como la habilidad de sufrir una gran deformación sin romperse y la recuperación posterior de la disposición original cuando el esfuerzo ha terminado, además de una gran resistencia a la fatiga [17, 18]. El origen de esa habilidad reside en su estructura, formada por secuencias recurrentes como las VPG, VPGVG, VPGG, VGVAPG, GVGVP, IPGVG [18-20]; siendo V=Valina, P=Prolina, G=Glicina, A=Alanina e I=Isoleucina (ver apartado 11.2 Código de aminoácidos).

El comportamiento quizá más sorprendente de esta proteína, ha sido descubierto en un fragmento de la α -elastina. Según las investigaciones originales del grupo D. W. Urry [21], la α -elastina, en disolución acuosa experimenta una transición de un estado desordenado a un estado ordenado, en el que las moléculas son capaces de agregarse formando una fase densa y pegajosa. Lo curioso de la transición desorden-orden, es que se da cuando la temperatura de la disolución aumenta, por lo que es un comportamiento en contra de la tendencia habitual de los sistemas físicos, en los que el orden aumenta a temperaturas decrecientes debido a que la agitación térmica no vence las fuerzas inter-intramoleculares que llevan al material a una disposición regular [22].

4.2.1 Definición y características fundamentales (ELPs)

Los polímeros tipo elastina (ELPs) son un nuevo tipo de polímeros proteicos. Todos ellos están basados en la recurrencia de los motivos que son considerados “bloques de construcción” en la elastina natural [22].

La composición más común es poli(VPGXG), en el que X representa un aminoácido natural a excepción de la prolina. En función de ese aminoácido, el polímero tendrá unas propiedades físico-química u otras [23]. La gran mayoría de los ELPs sintéticos descritos en la bibliografía han sido sintetizados a partir de modificaciones seleccionadas de ese pentámero o sus permutaciones, sustituyendo uno o más aminoácidos del pentámero original por otros naturales o modificados.

El desarrollo de tecnologías de ADN recombinante molecular ha permitido el diseño y la manufactura de materiales explotando las habilidades de las proteínas naturales [24]. Así, se hace posible el control total de la secuencia de los polímeros permitiendo diseñar de forma muy precisa las funcionalidades finales del biomaterial. Estos polímeros sintetizados mediante técnicas de Ingeniería genética son denominados entonces como recombinámeros tipo elastina, ELRs, reemplazando la nomenclatura convencional de ELPs [25].

Los ELRs además de las propiedades específicas proporcionadas mediante el diseño genético y modificaciones químicas posteriores, poseen las características extraordinarias de la elastina, como son: biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad de autoensamblado y bioactividad; son capaces de sustituir y regenerar un tejido dañado; y se adaptan, remodelan y degradan como la elastina natural. Asimismo, estos polímeros presentan una naturaleza inteligente al tener la capacidad de respuesta ante estímulos como la temperatura, el pH o la radiación luminosa [22, 25, 26].

Todos los ELPs funcionales muestran la denominada **Temperatura de Transición Inversa (TTI)**. Esto es un comportamiento de transición de fase, en medio acuoso, en función de la temperatura, (**Figura 4.3**):

- Por debajo de la TTI, las cadenas poliméricas se encuentran en estado de desorden conformacional, en el que la cadena está extendida con disposición al azar. El polímero es soluble y da lugar a disoluciones transparentes debido a la hidratación hidrófoba.
- Al aumentar la temperatura de la disolución por encima de la TTI, el polímero sufre un cambio de estado, se pliega y ensambla adoptando una disposición ordenada, regular y no aleatoria conocida como espiral β . En este estado, el polímero comenzará a formar agregados, que precipitarán de la disolución y causarán un abrupto aumento de la turbidez del sistema [22].

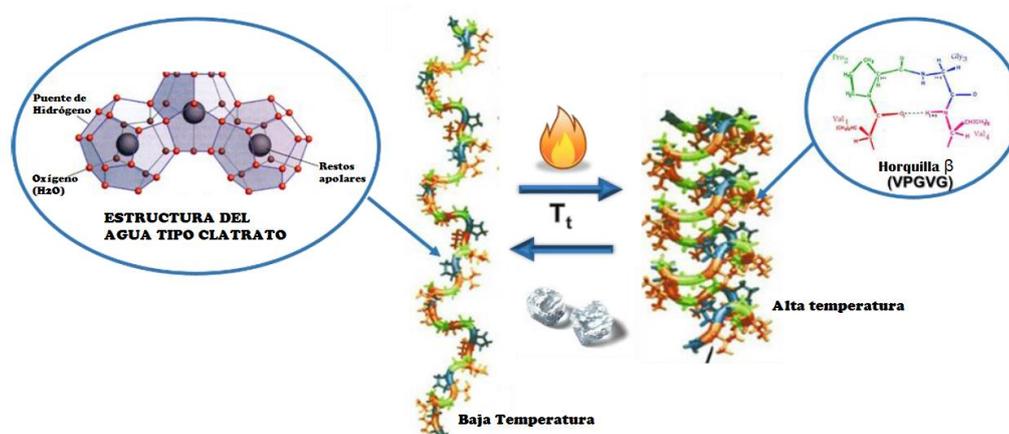


Figura 4.3 Esquema de la transición térmica de los polímeros tipo elastina: a bajas T^a estructura tipo clatrato de las moléculas del agua alrededor de restos apolares, y a temperaturas elevadas, repliegue en horquilla β (VPGVG pentapéptidos)

Es remarcable el hecho que aumentando la temperatura los ELRs sean cada vez más ordenados, mientras que el resto de proteínas tienden al desplegamiento y desnaturalización [18, 27]. La temperatura de transición en los polímeros tipo elastina, suele ser cercana a la temperatura ambiente o fisiológica, y está determinada por parámetros físicos y químicos. Estos factores se pueden clasificar en:

- **Factores Intrínsecos:** Efectos de las sales disueltas, efectos de la presión, efectos de los solutos tipo orgánicos (incluyendo detergentes iónicos o neutros).
- **Factores Extrínsecos:** Concentración de la disolución, secuencia de aminoácidos del ELR, longitud de cadena, variación de pH, cambios en el grado de ionización de las cadenas laterales.

4.2.2 Aplicaciones de los polímeros tipo Elastina

Los ELRs obtenidos a partir de las tecnologías de ADN recombinante permiten un control muy preciso de la composición de aminoácidos. Esta tecnología abre la posibilidad del diseño de recombinantes con propiedades específicas para una determinada aplicación. El grado de control y la complejidad alcanzada por ingeniería genética es claramente superior a la conseguida por síntesis química convencional [28].

Esta versatilidad de diseño, junto con su alta biocompatibilidad, bioactividad y comportamiento auto-ensamblaje [29], hace de los ELRs materiales inigualables para los estudios en el campo biomédico. Como resultado, los ELRs se han utilizado en una amplia variedad de aplicaciones, tales como ingeniería de tejidos [30], liberación de fármacos [31] e imagen médica [32]. También se han aplicado en el campo de la nanotecnología debido a la gama de construcciones nanoestructuradas, tales como nanofibras [33], nanopartículas [34], películas, micelas, agregados o superficies biofuncionalizadas [27] que se pueden formar a partir de ellos, ver **Figura 4.4**.

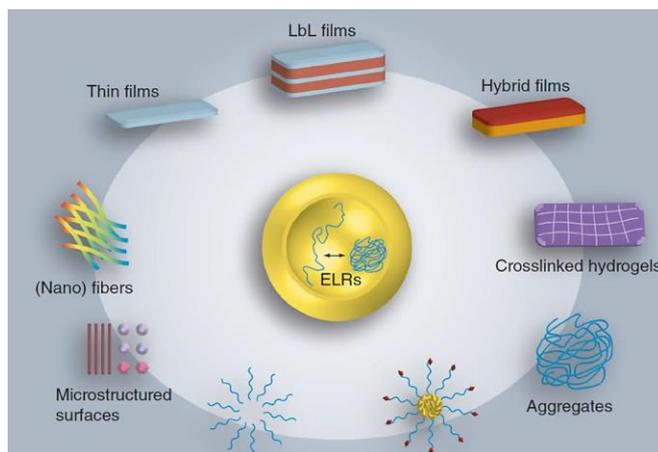


Figura 4.4 Resumen de las diferentes estructuras que pueden sintetizarse con los sistemas ELR para aplicaciones biomédicas [35].

En el presente TFG se desarrolla la técnica de síntesis de nanofibras a partir de los recombinámeros tipo elastina.

Entre las aplicaciones no biomédicas que se están desarrollando, el concepto de liberación de sustancias desde reservorios realizados con estos materiales, se expande a la dosificación controlada de pesticidas. En el área de la robótica estos materiales tienen comportamiento simultáneo de sensores y actuadores. También presentan importantes propiedades como elementos nanotecnológicos, debido a su capacidad de autoorganización espontánea en nanopartículas inteligentes cuando la temperatura excede el

valor de TTI. Además, la matriz elástica, siendo predominantemente de naturaleza elástica entrópica, tiene una durabilidad extraordinaria [36].

4.3 HIDROGELES

4.3.1 Definición y características

El término de hidrogel se utiliza para describir las estructuras de redes poliméricas entrecruzadas, obtenidos a partir de polímeros naturales y/o sintéticos, capaces de absorber y retener grandes cantidades de agua. La estructura de hidrogel es creada por los grupos o dominios presentes en una red polimérica que son hidratados en medio acuoso [37, 38].

Últimamente se han desarrollado un gran número de hidrogeles que difieren en estructura, composición y propiedades con aplicaciones médicas como lentes de contacto, biosensores, revestimiento para implantes artificiales y dispositivos de administración de fármacos [39].

La gelificación es el mecanismo de formación de estas redes en lo referente a la formación de enlaces entre las cadenas macromoleculares, por lo que se conduce a la progresiva ramificación de los polímeros, dependiendo de la estructura y conformación del material de partida.

Así la mezcla del polímero ramificado soluble poldispersa se denomina “sol”. El proceso de entrecruzamiento tiene como resultado un aumento del tamaño del polímero ramificado, que conlleva una disminución de la solubilidad. Esta forma del polímero se denomina “gel” o “red” y se compone de polímeros ramificados finitos. La transición entre ambos estados se denomina transición sol-gel o gelificación, conociéndose el punto crítico en el que aparece el gel por primera vez como “punto de gel”.

Los diferentes tipos de mecanismo de gelificación se resumen en la **Figura 4.5**. La gelificación puede tener lugar ya sea por conexión física o por enlace químico. Los geles físicos se subdividen en geles fuertes y débiles, donde los primeros son aquellos con fuertes enlaces físicos entre las cadenas poliméricas, siendo permanentes en un conjunto de condiciones experimentales. Algunos ejemplos son los nódulos vidriosos, microcristales laminares o hélices dobles y triples. Sin embargo los geles físicos débiles se caracterizan por formar enlaces reversibles formados a partir de asociaciones temporales entre las cadenas, algunos de los ejemplos son enlaces de hidrógeno, asociaciones iónicas e hidrofóbicas, micelas de copolímeros, etc [37].

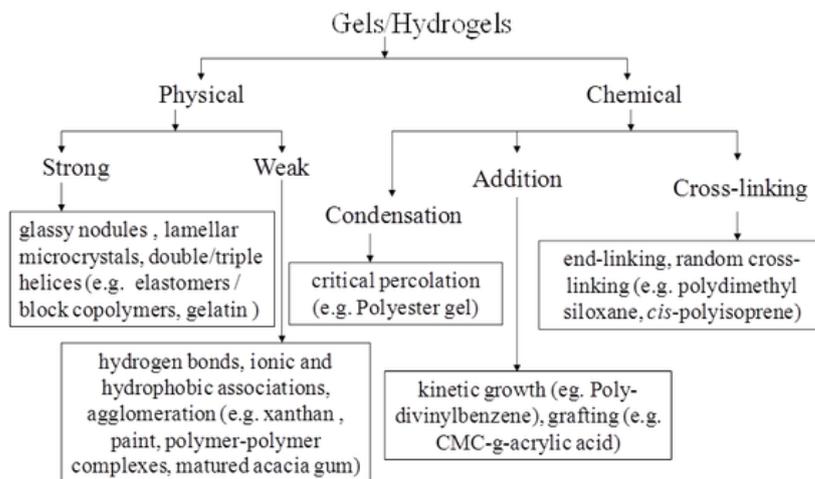


Figura 4.5 Clasificación de los tipos de gelificación [37].

En cuanto a la gelificación química se distinguen los procesos de condensación, adición y entrecruzamiento en general. Este tipo de gelificación conlleva enlaces químicos covalentes fuertes y estables entre las cadenas. Se alcanza un estado de equilibrio del hinchamiento que depende del parámetro de interacción polímero-agua y la densidad de entrecruzamiento [37].

La capacidad de retención de agua y la permeabilidad son los rasgos característicos más importantes de un hidrogel. Los grupos hidrófilos polares son los primeros en hidratarse en el contacto con el agua, exponiendo a los grupos hidrófobos a interactuar también con las moléculas de agua. Adicionalmente se absorbe agua debido a la fuerza osmótica impulsora de las cadenas de la red hacia dilución infinita. Se alcanza entonces un equilibrio de hinchamiento.

Dependiendo de la naturaleza y composición del hidrogel, si el entrecruzamiento es degradable, se puede producir la desintegración y/o disolución del hidrogel. Los hidrogeles biodegradables, que contienen enlaces lábiles, son importantes en aplicaciones de ingeniería de tejidos, cicatrización de heridas y administración de fármacos. Esos enlaces pueden romperse en condiciones fisiológicas, ya sea enzimáticamente o químicamente, casi siempre por hidrólisis.

La biocompatibilidad con el sistema inmune es la tercera propiedad más característica requerida en un hidrogel. Generalmente, poseen una buena biocompatibilidad debido a que su superficie hidrófila tiene una energía interfacial baja cuando está en contacto con los fluidos corporales, lo que resulta en una baja tendencia de proteínas y células a adherirse a estas superficies. Además, la naturaleza suave y elástica de los hidrogeles minimiza la irritación al tejido circundante.

El entrecruzamiento entre las diferentes cadenas del polímero tiene como resultado un comportamiento viscoelástico y en ocasiones puramente elástico, proporcionando al gel elasticidad y consistencia. Además, debido al importante contenido en agua poseen un grado de flexibilidad similar al tejido natural. Es posible cambiar la química del hidrogel mediante el control de su polaridad, propiedades de superficie, propiedades mecánicas y comportamiento de hinchamiento [37].

Existen también hidrogeles con sensibilidad y capacidad de respuesta ante los estímulos del entorno como la temperatura, la luz, el pH y la presencia de electrolitos. Son similares a los hidrogeles convencionales, salvo que pueden exhibir cambios significativos de volumen en respuesta a pequeños cambios en esos factores [37].

4.3.2 Hidrogeles Fotosensibles

Los hidrogeles sintetizados en el presente TFG serán (I) fotopolimerizados, puesto que se llevará a cabo la reacción de entrecruzamiento químico por irradiación de luz UV-Vis, debido a la presencia en los biopolímeros de grupos fotoiniciadores, y a su vez serán (II) fotosensibles, ya que una vez sintetizados tendrán comportamiento diferente frente a la luz y la oscuridad.

(I) *Obtención fotopolimérica de los hidrogeles:*

Los hidrogeles se obtienen a partir de la incorporación, en las cadenas poliméricas, de grupos fotocromáticos, capaces de cambiar entre dos o más estados electrónicos al ser irradiados por luz de una longitud de onda específica.

Así, estos hidrogeles se pueden fotopolimerizar *in vivo* e *in vitro* mediante la interacción de la luz visible o UV con los compuestos sensibles a la luz, denominados fotoiniciadores, generando radicales libres. De esta forma, se convierte un monómero o macrómero en un hidrogel entrecruzado vía fotopolimerización de una forma rápida y controlada bajo condiciones ambiente o fisiológicas [39].

La fotopolimerización tiene varias ventajas sobre los métodos de polimerización convencional. Éstos incluyen un control espacial y temporal de la polimerización, velocidades rápidas a temperatura ambiente o fisiológica y la mínima producción de calor. Una de las principales ventajas es que pueden ser creados *in situ* a partir de precursores acuosos utilizando fotopolimerización de una manera mínimamente invasiva.

La fabricación de polímeros *in situ* es atractivo en una gran variedad de aplicaciones biomédicas, puesto que se producen formas complejas que se adhieren y ajustan a las estructuras de tejidos [39].

Los agentes y reactivos entrecruzantes que contienen grupos funcionales de aril azidas, o diazirinas son capaces de reaccionar formando enlaces covalentes con otras moléculas cuando son activados por la luz ultravioleta. Las propiedades no específicas y activables de esta clase de reactivos les hace particularmente útiles para muchas aplicaciones de investigación, incluyendo estudios de interacciones de las proteínas, aislamiento de proteínas de la superficie celular, etc. Existen varias formas específicas de compuestos aril azida, ver **Figura 4.6**, cuyo mecanismo de la reacción general es el mismo, pero difieren ligeramente en la estabilidad, eficiencia y absorbancia [40].

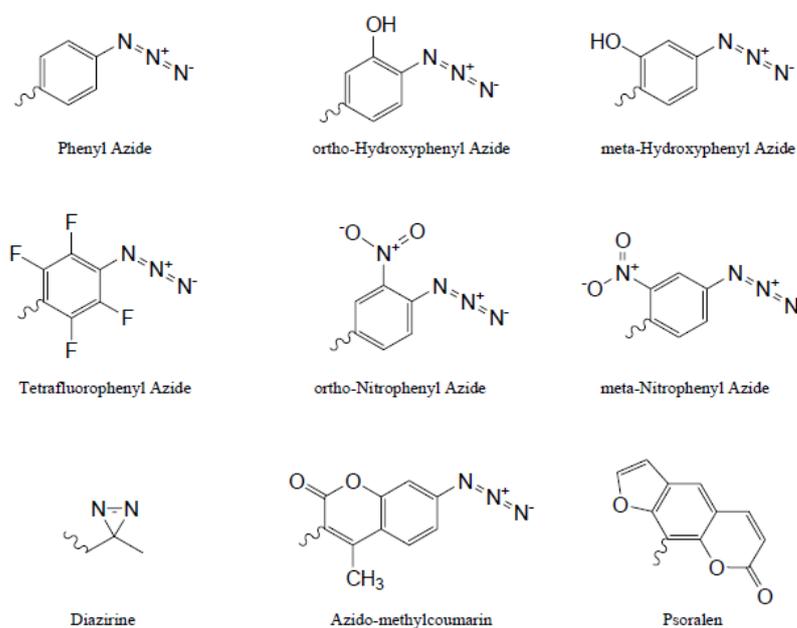


Figura 4.6 Formas de aril azida y otros grupos reactivos usados en el entrecruzamiento fotoreactivo.

Cuando un grupo aril azida es expuesto a la luz UV, da lugar a la formación casi instantánea de grupos nitreno. Este grupo puede iniciar reacciones de adición con dobles enlaces, atacando sobre los sitios C-H y N-H, o dar lugar a la expansión del anillo para reaccionar como nucleófilo con aminas primarias. Este último camino de reacción domina cuando hay aminas primarias presentes en la muestra [40].

En este TFG trabajaremos con polímeros modificados con el grupo fenil azido por lo que se introduce brevemente su forma de reaccionar.

La mecánica en detalle de la descomposición del grupo fenil azido es compleja y ha sido estudiada extensamente por muchas técnicas. A partir de la fotólisis del grupo fenil azido se obtienen muchos reactivos intermedios, siendo el intermediario clave el reactivo fenil nitreno, ver **Figura 4.7** [41].

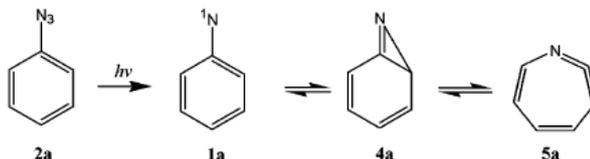


Figura 4.7 Esquema de la fotólisis de fenil azida y los derivados del fenil nitreno.

Tras generar el fenil nitreno, dependiendo de las condiciones de reacción puede tomar diferentes rutas para liberar su energía, ver **Figura 4.8** [42].

Los nitrenos están involucrados en muchas transformaciones útiles en síntesis orgánica, por lo que han atraído el interés de un diverso grupo de científicos. Los investigadores en fisicoquímica orgánica buscan entender el papel de estos intermediarios en las reacciones. Los químicos de materiales buscan enlazar sondas a la superficie de diversos polímeros a través de reacciones con nitrenos. Los bioquímicos utilizan los grupos azido ($-N_3$) como ligantes de macromoléculas biológicas, a través de la fotólisis de un complejo azida-biomolécula, lo cual puede generar un enlace covalente del ligando hacia la biomolécula. Esta técnica, creada por Singh y colaboradores, con carbenos, y más tarde por Knowles y Bayley, con nitrenos, es actualmente conocida como marcado por fotoafinidad [42].

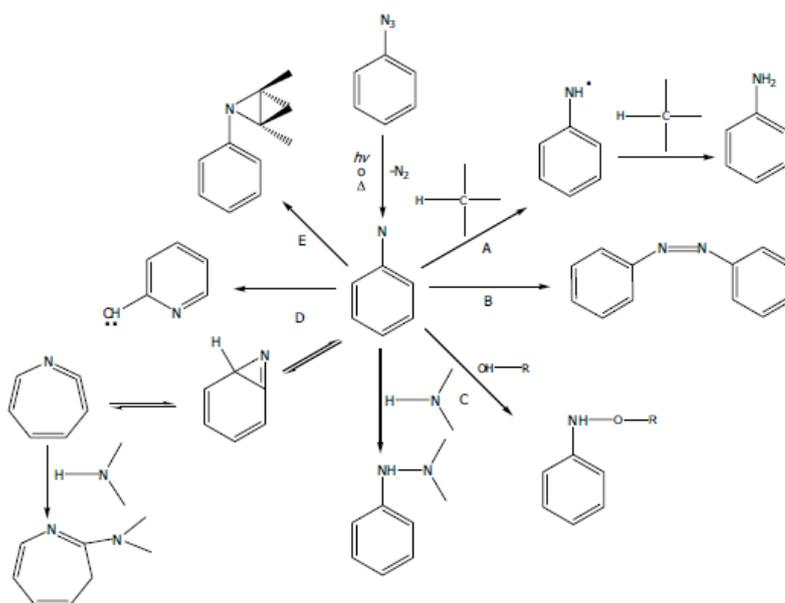


Figura 4.8 Esquema de las diferentes reacciones que puede llevar a cabo a partir del fenilnitreno, tales como abstracción de un átomo de hidrógeno (A), dimerización (B), inserción (C), reacciones de reordenamiento (D) y adición (E) [42].

(II) Fotosensibilidad del hidrogel:

Los hidrogeles sintetizados en el presente TFG serán fotosensibles debido al comportamiento del grupo funcional afenilzobenceno. Éste presenta dos isómeros geométricos diferentes: el isómero trans, con forma alargada, y el isómero cis, con forma curvada, representados en la **Figura 4.9**, que pueden convertirse entre ellos de manera reversible [43].

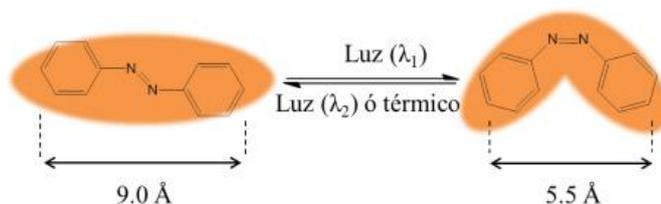


Figura 4.9 Fotoisomerización del fenilazobenceno, isómero Trans (izquierda), isómero Cis (derecha).

La isomerización puede ser inducida con luz en el rango UV-Vis en ambas direcciones, de trans a cis (λ_1) y de cis a trans (λ_2), mientras que el isómero cis también puede regresar al estado trans, que es el isómero termodinámicamente más estable, a través de una relajación térmica, **Figura 4.9**. Este proceso lleva asociadas modificaciones en el espectro de absorción óptica, así como en la estructura de cada isómero, lo que se refleja en el cambio de las dimensiones geométricas y en el momento dipolar de la molécula [44].

4.3.3 Aplicaciones de los hidrogeles

Los hidrogeles fotopolimerizados están siendo investigados para un gran número de aplicaciones biomédicas, entre las que se incluyen la prevención de trombosis [45], la formación de adhesiones post-operatorio [46], liberación de fármacos [47], revestimientos para biosensores [48] y para el trasplante de células [49]. [39]

En el campo de la ingeniería de tejidos, destacan las funciones de:

- *Hidrogeles como barrera*: para mejorar la respuesta de curación ante la lesión de tejidos [45]. Se incluyen en la prevención de la trombosis y reestenosis después de una lesión vascular y la formación de adherencias post-operatorio. Consisten en barreras altamente resistentes a la adsorción y difusión de proteínas así como a la adhesión celular [39].
- *Sistemas de liberación de fármacos*: para entrega localizada de fármacos [50], los hidrogeles son utilizados como vehículos de éstos debido a su compatibilidad con fármacos hidrofílicos y macromoleculares como proteínas u oligonucleótidos, su buena biocompatibilidad, y la facilidad de

regulación de la liberación de las sustancias controlando el hinchamiento, la densidad de entrecruzamiento, y la degradación. Se utilizan, entre otros objetivos, para la entrega local de diversos agentes para prevenir la formación de adherencias post-operatorio actuando de forma sinérgica con el efecto de barrera [39].

- *Hidrogeles para encapsulación de células*: para el trasplante de células, debido a que los hidrogeles proporcionan inmunoaislamiento, pero permitiendo la fácil difusión de oxígeno, nutrientes y productos metabólicos [39, 51].
- *Estructuras para rellenar espacios*: hidrogeles utilizados para mantener un volumen deseado y la integridad estructural durante un tiempo requerido. Utilizados por ejemplo en tratamientos de incontinencia urinaria y reflujo vesicoureteral, y son necesarios en cirugía plástica y reconstructiva [52]. También han encontrado gran utilidad en la prevención de adherencias post-operatorias [53] y pueden funcionar como adhesivos biológicos para tejidos blandos [54].
- *Materiales estructurales (ECM)*: debido a las propiedades mecánicas que se pueden conseguir en los hidrogeles, estos pueden ser adaptados para coincidir con muchos tejidos blandos, sirviendo de soporte, para el desarrollo o la regeneración de los tejidos, como por ejemplo la regeneración de los cartílagos [55] o el crecimiento celular vascular [39].

4.4 ELECTROHILADO

4.4.1 Historia electrohilado

La técnica de electrohilado es una técnica antigua, siendo contemplada por primera vez por Rayleigh [56] en 1897 y por Zeleny [57] en 1914 y patentada por autores como Cooley, Morton y Formhals [58]. Precisamente, éste último en 1934 logró describir de forma explícita el proceso, para ello trabajó en su primera patente con acetato de celulosa para producir hilos textiles, mientras que en la segunda ensambló un nuevo sistema con un mayor control de la distancia entre el capilar y el colector, con el cual redujo considerablemente los inconvenientes de sus primeras investigaciones.

Vonnegut y Newbauer en 1952, inventaron un simple aparato para la atomización eléctrica y la producción de corrientes de gotas altamente electrificadas y uniformes de aproximadamente 0.1 mm de diámetro [59]. Después de ellos, Drozin en 1955, investigó la dispersión de una serie de líquidos en aerosoles bajo altos potenciales eléctricos [60] y Simons en 1966,

patentó un aparato de producción de telas no tejidas ultrafinas y con diferentes patrones utilizando el electrohilado [61]. En 1971, Baumgarten construyó un aparato para producir fibras acrílicas con diámetros en el rango de 0.05-1.1 μm [62].

A partir de los años 80 y especialmente en la época más reciente, la técnica de electrohilado se ha convertido en un proceso muy atractivo debido al creciente interés en la nanotecnología y gracias a la habilidad de transformar un amplio rango de materiales en forma de nanofibras y estructuras fibrosas a bajo costo y con relativa simplicidad [63] [56].

4.4.2 Descripción, características.

Electrohilado es una técnica de hilado, que aprovecha la utilización de fuerzas electrostáticas para producir fibras finas a partir de disoluciones de polímeros. De esta manera las fibras producidas tienen un diámetro más pequeño, del orden de micro-nanómetros, y un área superficial mayor que las obtenidas a partir de procesos de hilado convencionales.

Para generar este proceso de electrohilado se requiere un voltaje de corriente directa en un rango de varias decenas de kV, basándose en el principio de que las fuerzas eléctricas repulsivas aplicadas superan a las fuerzas más débiles de tensión superficial en el líquido polimérico cargado [64].

Actualmente existen dos configuraciones de electrohilado estándar, posición vertical y horizontal. En el montaje en horizontal se evita la contaminación de la muestra por el goteo de la disolución sin electrohilar, mientras que en el montaje vertical, la gravedad a su vez es una fuerza que ayuda al campo eléctrico en el avance de la disolución. La expansión de esta tecnología ha llevado a diferentes grupos de investigación a desarrollar sistemas capaces de fabricar nanofibras con estructuras cada vez más complejas de formas más eficientes y controladas [65].

Normalmente, el electrohilado es llevado a cabo a temperatura ambiente, bajo condiciones atmosféricas. El montaje característico del aparato en conjunto se muestra en la **Figura 4.10**.

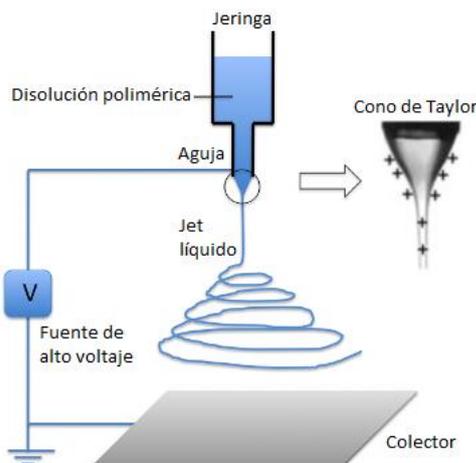


Figura 4.10 Esquema de montaje y componentes necesarios para electrohilado.

Básicamente, un sistema de electrohilado consta de tres componentes principales, una fuente de alimentación de alta tensión, un colector (placa de metal, aluminio, ITO, etc.) y una jeringa con su aguja correspondiente. Se utiliza la fuente de alto voltaje para cargar con una cierta polaridad la disolución polimérica, la cual es posteriormente acelerada hacia el colector de polaridad opuesta [66].

Los polímeros son disueltos en un solvente volátil antes del electrohilado formando la disolución polimérica que se introduce en el tubo capilar.

En el proceso de electrohilado, la salida de la disolución depende de su tensión superficial en el final del tubo capilar. Por tanto, se somete a un campo eléctrico que induce una carga eléctrica en la superficie del líquido. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas de repulsión superan a las fuerzas de tensión superficial del líquido.

Finalmente, un hilo cargado de la disolución, es expulsado por la punta del cono de Taylor, **Figura 4.11**, como una rápida sacudida inestable que ocurre entre la punta del capilar y el colector, lo que permite la evaporación del disolvente, obteniendo únicamente una fibra de polímero. Es por ello que el proceso de electrohilado ofrece una técnica simplificada para la formación de fibras [56].

El cono de Taylor es una forma estable de la suspensión de la disolución polimérica en la punta de la aguja. Ésta surge como resultado del equilibrio entre las fuerzas eléctricas aplicadas y la tensión superficial en los casos de líquidos no viscosos, newtonianos y viscoelásticos. Entonces, el cuerpo líquido adquiere una forma cónica (**Figura 4.11**) que se refiere como cono de Taylor, y tiene un ángulo medio de 49.3° . El cono cambia de forma a medida que se modifica el potencial, partiendo de una gota con bajos potenciales hasta la forma cónica bien definida en los potenciales mayores [67].

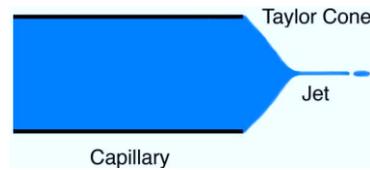


Figura 4.11 Forma teórica, ideal, del cono de Taylor para la eyección de fibras.

4.4.3 Parámetros generales

Los parámetros que influyen en la técnica de electrohilado se pueden clasificar dentro de cuatro grupos:

- 1- Parámetros del polímero
- 2- Parámetros de la disolución
- 3- Parámetros del proceso
- 4- Parámetros de laboratorio o ambientales

Los parámetros considerados en cada grupo, son aquellos que tienen un papel importante en morfología, diámetro y longitud de las nanofibras obtenidas. Las propiedades del polímero analizadas son el peso molecular y la solubilidad. Los parámetros de la disolución estudiados son concentración, viscosidad, conductividad y tensión superficial. Los factores del proceso considerados son la velocidad de flujo, el voltaje, el diámetro de la aguja y la distancia entre la punta y el colector. Por último, los factores ambientales son la temperatura, la humedad y la presión atmosférica [68].

4.4.3.1 Parámetros del polímero

Peso Molecular

El peso molecular del polímero tiene un efecto importante en la morfología de las fibras obtenidas así como en sus propiedades reológicas y eléctricas tales como viscosidad, tensión superficial, conductividad y fuerza dieléctrica [56]. En general, se utilizan polímeros de altos pesos moleculares ya que proveen la viscosidad necesaria para la formación de fibras. Según estudios realizados por diferentes investigadores, disminuyendo el peso molecular del polímero se tiende a la formación de cuentas mientras que incrementándolo se obtienen fibras largas y se disminuye la concentración mínima requerida para su formación [69]. Un mayor aumento el peso molecular, se consiguen micro-cintas con un diámetro medio mayor, ver **Figura 4.12**. [70, 71].

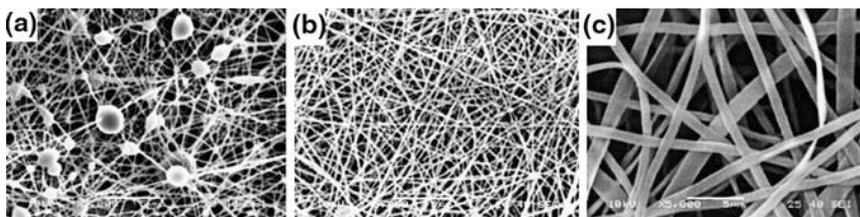


Figura 4.12 a) fibras con cuentas, b) fibras finas, c) micro-cintas

Sin embargo, el peso molecular no es esencial si existen interacciones intermoleculares suficientes para sustituir la conectividad intercadena [70].

4.4.3.2 Parámetros de la disolución

Concentración

La concentración es uno de los parámetros determinantes del tamaño y morfología de las fibras y se requiere siempre un valor para que se produzcan los entrecruzamientos [56]. Sin embargo, la disolución no puede ser demasiado diluida o concentrada puesto que la concentración de la disolución influye tanto en la viscosidad como en la tensión superficial, variables muy importantes. Entonces, con disoluciones muy diluidas la fibra se divide en gotas y cuentas antes de llegar al colector debido al dominio de la tensión superficial sobre la baja viscosidad. Al ir aumentando el valor de la concentración, **Figura 4.13**, y por tanto la viscosidad, los grumos van adquiriendo forma de fibras alargadas cada vez más regulares, uniformes y de mayor diámetro, hasta concentraciones muy elevadas en las que los lazos obtenidos no son continuos debido a la incapacidad de mantener el flujo por una altísima viscosidad dentro del capilar [69, 70, 72].

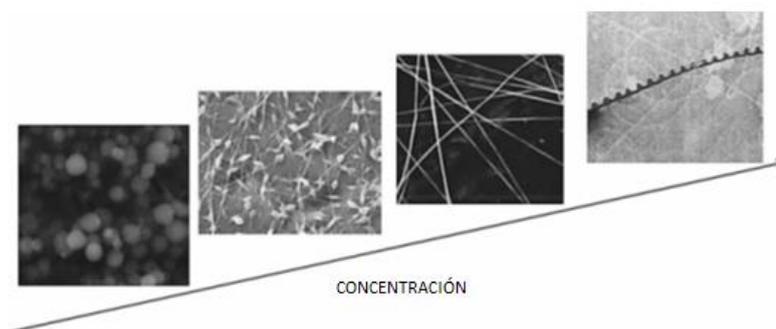


Figura 4.13 Imágenes SEM de la evolución del producto obtenido por electrohilado a diferentes concentraciones.

Viscosidad

La viscosidad de la disolución es un aspecto clave en la determinación de la morfología de la fibra. Se ha demostrado que fibras finas y continuas no pueden ser obtenidas con baja viscosidad debido a que la tensión superficial es el factor dominante y conlleva la formación de cuentas, mientras que

niveles muy elevados de viscosidad hacen muy difícil la eyección de fibras por la aguja. Un aumento de la viscosidad de la disolución origina un mayor y más uniforme diámetro de fibra. Por tanto, se requiere una viscosidad adecuada para el proceso de electrohilado que generalmente puede ser modificada ajustando la concentración polimérica. Es importante remarcar que viscosidad, concentración y peso molecular están directamente relacionados los unos con los otros a lo largo del proceso [56, 70].

Conductividad

La conductividad de una disolución está principalmente determinada por el tipo de polímero, el tipo de disolvente y las sales [70]. Una mayor conductividad del disolvente implica una mayor fuerza eléctrica para el estiramiento del chorro, lo que promueve una reducción del diámetro de fibra. Se descubrió que un aumento en la conductividad de la disolución o su densidad de carga, conlleva a la producción de fibras uniformes con poca presencia de cuentas. Así, soluciones con una conductividad alta tendrán mayor capacidad de transportar las cargas de la disolución que aquellas con baja conductividad [56].

En definitiva, se observó la disminución en el diámetro de las fibras al aumentar la conductividad, mientras que al disminuirla el alargamiento del chorro es insuficiente impidiendo la producción de fibras uniformes [69, 72].

Tensión superficial

La tensión superficial es función de la composición del disolvente en la disolución, y se trata de un factor importante en electrohilado. Los investigadores Doshi y Reneker [73] descubrieron que reduciendo la tensión de la disolución, las fibras con cuentas se convierten en fibras finas, ver **Figura 4.14**. La tensión superficial intenta reducir el área por unidad de masa, cambiando los chorros por esferas. Por ello, se aplica un voltaje elevado que se oponga a la tensión superficial, y produzca un aumento de la superficie favoreciendo la formación de chorros delgados. Con ello se consigue establecer un rango determinado de operación en el caso de mantener el resto de factores constantes [72].

Además demostraron que la tensión superficial y la viscosidad de una disolución pueden ser ajustadas cambiando la relación en la mezcla de disolventes [69, 70].

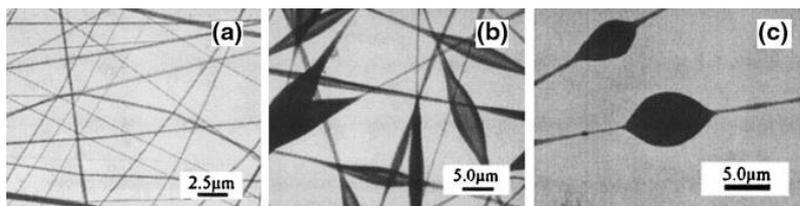


Figura 4.14 Imágenes de TEM de nanofibras de PVP en diferentes disolventes con distintas tensiones superficiales.

Disolvente

Varios investigadores han estudiado el efecto en la morfología, estructura y propiedades mecánicas y térmicas de disolventes con diferentes propiedades como cloroformo, etanol, dimetilformamida, mezcla de ácido trifluoroacético y diclorometano, agua y trifluoroetanol [56].

La morfología y el tamaño de las nanofibras dependen fuertemente de las propiedades de la disolución, **Figura 4.15**. Es importante la selección de un disolvente con tensión superficial baja, ya que como se ha detallado anteriormente, reduce la presencia de cuentas y favorece la obtención de fibras. Además, una alta volatilidad del disolvente favorece su evaporación por el campo eléctrico, evitando la contaminación del colector. La interrelación de todos los parámetros debe ser analizada a la hora de seleccionar el disolvente, o la mezcla, que más interesa para trabajar [56].

Solvents	Surface tension (mN/m)	Dielectric constant	Boiling point (°C)	Density (g/ml)
Chloroform	26.5	4.8	61.6	1.498
Dimethyl formamide	37.1	38.3	153	0.994
Hexafluoro isopropanol	16.1	16.70	58.2	1.596
Tetrahydrofuran	26.4	7.5	66	0.886
Trifluoro ethanol	21.1	27	78	1.393
Acetone	25.20	21	56.1	0.786
Water	72.8	80	100	1.000
Methanol	22.3	33	64.5	0.791
Acetic acid	26.9	6.2	118.1	1.049
Formic acid	37	58	100	1.21
Dichloro methane	27.2	9.1	40	1.326
Ethanol	21.9	24	78.3	0.789
Tri fluoro acetic acid	13.5	8.4	72.4	1.525

Figura 4.15 Propiedades de diferentes disolventes utilizados en electrohilado.

En el presente TFG se utilizará como disolvente el trifluoroetanol (TFE), debido a su baja tensión superficial (26.4 mN/m). Inicialmente se pensó utilizar agua milliQ como disolvente, pero en las primeras pruebas realizadas se descartó debido a su elevada tensión superficial (72.8 mN/m) y a la humedad de las condiciones de trabajo. Esa humedad es debida a la condición necesaria de trabajar en cámara fría, a 4°C, como consecuencia de que los biopolímeros sólo permanecen disueltos en medio acuoso por debajo

de su temperatura de transición inversa, y ésta suele ser menor que la temperatura ambiente.

4.4.3.3 Parámetros del proceso

Velocidad de flujo

Los estudios realizados acerca de la relación entre la velocidad de flujo de alimentación y la morfología y tamaño de las fibras, generalmente, se encontraron con que utilizando flujos bajos se obtenían fibras con diámetros menores, por lo que se considera lo recomendado. Asimismo, cuando la velocidad de flujo es demasiado alta, se obtiene como resultado fibras de diámetro muy grueso y un aumento considerable de los defectos, debido a que no puede evaporarse el disolvente antes de llegar al colector [69, 70].

Por tanto, debe ser mantenido un mínimo valor del volumen de salida de disolución para obtener un cono de Taylor estable y a su vez este flujo debe ser lo suficientemente bajo para permitir la evaporación del disolvente [72].

Voltaje

Solamente aplicando un voltaje superior a un umbral es posible que las fibras salgan eyectadas del cono de Taylor. Entonces, bajos voltajes implican que una gota está suspendida en la punta de la aguja y se produce un goteo constante de cuentas y gotitas [69].

Sin embargo el efecto del voltaje en el diámetro de las fibras es controvertido. Reneker y Chun [74] han concluido que no tiene mucho efecto el voltaje aplicado en el diámetro de las fibras de óxido de polietileno. Sin embargo, otros investigadores como Zhang et al. [75] sugieren que voltajes elevados facilitan la formación de fibras con mayores diámetros, debido a una mayor expulsión del polímero. Varios grupos de investigación proponen que voltajes elevados pueden incrementar la fuerza electrostática de repulsión en el chorro, favoreciendo el estrechamiento del diámetro. Además esos grupos han demostrado también que voltajes elevados aumenta la probabilidad de formación de cuentas, por rotura de las fibras [70].

Entonces se puede concluir que sí existe influencia del voltaje en el diámetro de fibra, pero el nivel de significancia varía dependiendo del resto de condiciones de concentración y la distancia colector-aguja [76].

Distancia aguja-colector

Se ha determinado que es necesaria una distancia mínima para permitir a las fibras el tiempo suficiente de secado antes de alcanzar el colector. Tanto con distancias muy cortas como muy lejanas, se observa la formación de cuentas sobre la superficie.

Es preciso encontrar la distancia óptima, en cada disolución, para favorecer la evaporación del disolvente. Algunos investigadores como Yuan et al. [77] demostraron que, trabajando dentro del rango óptimo, distancias más cercanas producen fibras más planas y menor diámetro, mientras que mayores distancias repercuten en una forma más redondeada [69, 70].

4.4.3.4 Parámetros de laboratorio o ambientales

Temperatura, Humedad y Presión atmosférica

Existen numerosos estudios que examinan los efectos de los parámetros ambientales en el proceso del electrohilado. Mit-Uppatham et al. [78] hallaron que al aumentar la temperatura se producía un diámetro de fibra menor, atribuyendo este resultado a la relación inversa entre la viscosidad de la disolución y la temperatura

En cuanto a la humedad, al ser un factor también variable, Casper et al. [79] realizaron estudios en los que con humedad baja se incrementaba la velocidad de evaporación del disolvente. Por el contrario, altas humedades conllevan diámetros de fibra gruesos debido a que las cargas del chorro pueden ser neutralizadas, y las fuerzas de estiramiento se hacen pequeñas. Los estudios revelaron también que a medida que incrementaban la humedad, se observaba la producción de pequeños poros circulares en las fibras [69].

En resumen, se han analizado cada uno de los factores que influyen en la técnica de electrohilado a pesar de que es difícil aislar los efectos de cada uno, debido a sus interrelaciones. Por tanto, en la elaboración de este TFG se ha llevado a cabo el estudio de todos estos parámetros, y de las experiencias realizadas por muchos autores previamente a la realización de las propias experiencias en el laboratorio.

4.4.4 Aplicaciones del Electrohilado

La producción de nanofibras mediante electrohilado ha crecido en popularidad en los últimos 15 años debido en gran parte al creciente interés en las tecnologías y propiedades de la nanociencia [69]. Esta técnica permite obtener fibras con una gran relación de área superficial entre masa, así como una alta porosidad con pequeño tamaño de los poros, flexibilidad y superiores propiedades mecánicas. Una de las características más atractivas del electrohilado es la simplicidad y el bajo coste de su utilización [69].

Las aplicaciones de las nanofibras abarcan muchos campos diferentes (**Figura 4.16**), tales como: filtración, ingeniería de tejidos, dispositivos de entrega de fármacos, tejidos protectores, refuerzo de materiales compuestos,

sensores medioambientales de alto rendimiento, catalizadores, investigaciones biomédicas, cicatrización de heridas, almacenamiento de energía, etc [68, 80-82].

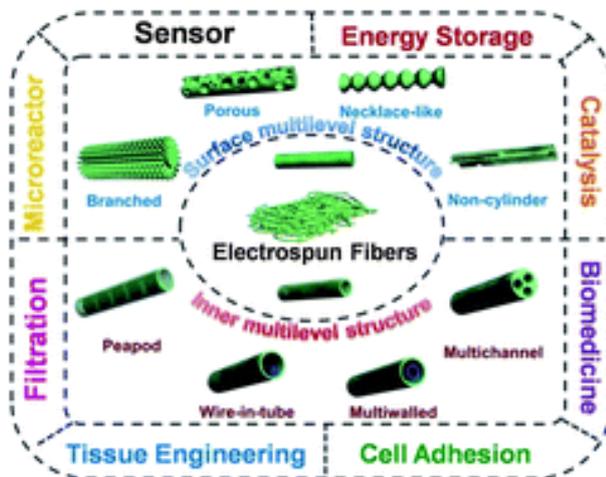


Figura 4.16 Diferentes tipos de aplicaciones en función de la nanoestructura [83].

Sin embargo debido a una baja productividad, del orden de 0.01-0.3 g/h se inhibe la aplicación de nanofibras a escala industrial por lo que se limita la posible comercialización. Se están investigando técnicas más efectivas y óptimas que permitan una producción masiva de nanofibras [80, 81].

Algunas de estas técnicas son: electrohilado mediante un rodillo cilíndrico giratorio como colector (Figura 4.17-a), electrohilado utilizando una punta generadora de los hilos en forma piramidal escalonada (Figura 4.17-b-c), coil electrohilado, electrohilado de burbujas generadas en el interior de la disolución [80, 81].

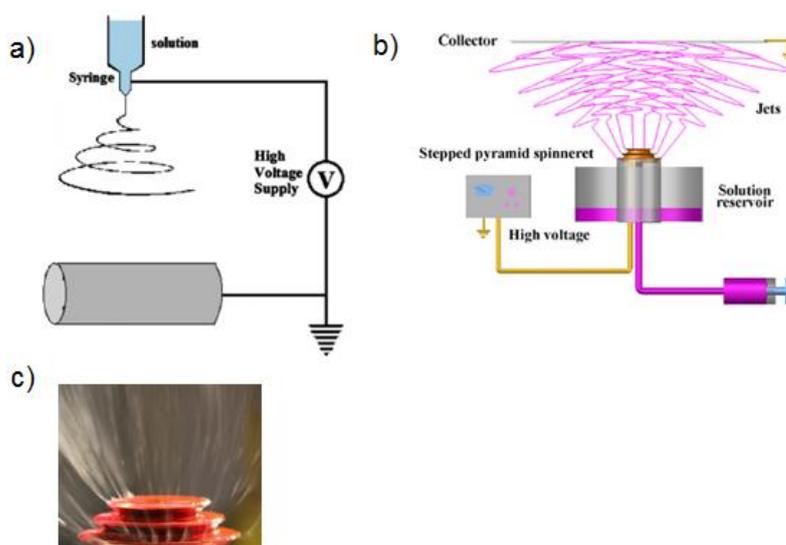


Figura 4.17 Diferentes técnicas de electrohilado, a) rodillo giratorio como colector [84], b-c) mediante punta piramidal escalonada [80].

Uno de los ejemplos de las aplicaciones del electrohilado está en la síntesis de tejidos neuronales que proporcionan una opción en el avance de los efectos terapéuticos comparado con los alcances tradicionales.

Estas estructuras neuronales, idealmente como se observa en la **Figura 4.18**, deben ser biocompatibles para favorecer la adhesión celular, la migración, la proliferación y la extensión axonal sin ningún tipo de citotoxicidad. Además debe ser una estructura biodegradable y proporcionar soporte mecánico suficiente en el período inicial de implantación.

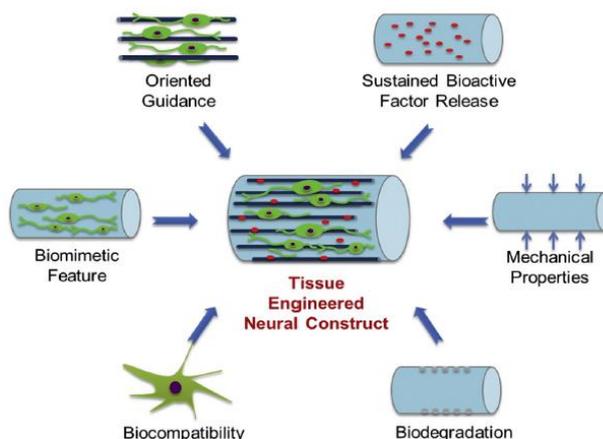


Figura 4.18 Características requeridas en el material para ingeniería de tejidos [84].

En este caso se integran las técnicas de electrohilado y electrospinning para la fabricación de una novedosa estructura neuronal biomimética con características nano y micro y un equilibrado ambiente para la liberación de factores bioactivos.

Para ello se alinean microfibras sobre una superficie colectora mediante electrohilado y se fabrican las nanoesferas con el factor encapsulado (core-shell) mediante electrospinning, depositándose sobre la estructura creada previamente, para lograr las estructuras nanocompuestas y favorecer el crecimiento celular neuronal (**Figura 4.18**). Las microfibras alineadas jugarán un papel importante como guías en la propagación axonal hacia el área dañada.

La técnica de electrohilado presenta una gran promesa en este tipo de aplicaciones debido a la facilidad de modificar las propiedades físicas y dimensiones mecánicas, así como de incorporar nanomateriales [84].

***PROCEDIMIENTO
EXPERIMENTAL***

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este apartado se recogen la relación de materiales de laboratorio, reactivos y disolventes utilizados para la elaboración de este trabajo. Se describirán también las técnicas utilizadas en el laboratorio, así como el procedimiento llevado a cabo para la realización de cada una de las etapas en que consiste este trabajo.

5.1 MATERIALES DE LABORATORIO

5.1.1 Materiales y equipos

En esta sección se hace mención a todo el material del laboratorio empleado, ya sea desechable o reutilizable, como: agujas, eppendorf, falcon, guantes, ITO, jeringuillas, parafilm, pipetas, micropipetas, tripas de diálisis, tubos capilares, pipetas Pasteur, papel de aluminio, botes de liofilización, pinzas, embudos, placas Petri, vasos de precipitados, frascos, etc.

Todo el material utilizado, que no sea desechable, se lava con agua, jabón, agua destilada y milliQ escrupulosamente después de su utilización, siguiendo el protocolo adecuado de lavado.

En la relación de los equipos utilizados en el laboratorio están las centrífugas, campanas de flujo laminar, espectrofotómetro, lámpara UV, fuente de alta tensión, bomba de infusión, cubeta electroforética, disruptor celular, sonicador, autoclave, microscopio óptico, microscopio electrónico, máquina de agua ultrapura, liofilizador, etc.

Asimismo se utilizan en el laboratorio pequeños equipos auxiliares como pHmetro, balanza, mechero, cronómetros, medidor de temperatura y humedad, estufa, congelador, frigorífico, microondas, máquina de hielo, agitadores, calibre, cámara de fotos, etc.

La relación de todo el material de laboratorio y de equipos utilizados se encuentra tabulada en los apartados 7.1 y 7.3 del *Estudio Económico*.

5.1.2 Reactivos y Disolventes

En las **Tablas 5.1, 5.2**, se recoge la relación de los reactivos y disolventes utilizados durante la elaboración de este TFG, en las etapas de bioproducción, modificación química y síntesis de hidrogeles, especificando el proveedor que lo suministra al G.I.R. BIOFORGE.

REACTIVO	PROVEEDOR
Ácido p-azidobenzoico (disuelto en terc-butil metil éter)	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico (HCl)	Fluka
Ácido etilendiaminotetraacético(EDTA)	Apollo
Ampicilina (antibiótico)	Apollo
Anhídrido triflico (Tf ₂ O)	Sigma-Aldrich
Azida de sodio	Acros Organics
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	Scharlau
DAPI	Lonza
Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	Sigma-Aldrich
Faloidina- Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio (NaOH)	Panreac
PBS	Gibco Invitrogen
Seroalbúmina bovina	Sigma Aldrich
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	Fluka
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	Sigma-Aldrich
Tritón X-100	Sigma-Aldrich

Tabla 5.1 Relación de reactivos utilizados y proveedores.

DISOLVENTE	PROVEEDOR
Acetona 99%	Scharlau
Agua destilada	Obtención Bioforge
Agua ultrapura (milliQ)	Obtención Bioforge
Diclorometano (DCM)	Sigma Aldrich
Dietil éter	Scharlau
Dimetilformamida (DMF)	Sigma Aldrich
Dimetil sulfóxido duterado (DMSO)	Sigma Aldrich
Metanol	Scharlau
Etanol	Panreac
Trifluoroetanol (TFE)	Acrós

Tabla 5.2 Relación de disolventes utilizados y proveedores.

TAMPONES	CÓDIGO	BUFFER	SAL	OTROS
Tampón de lavado 1	TLx10	Tris pH7.5 400 mM	NaCl 4M	-----
Tampón de sonicación	TS	Tris pH7.5 200mM	---	EDTA 25mM
Running buffer	RB	Tris pH8.3 15g	---	Glicina 72g, SDS 5g
Loading buffer	LB	Tris 1M pH6.5		Glicerol, SDS, 2-ME, Bromofenol

Tabla 5.3 Relación de disoluciones tamponadas empleadas.

5.1.3 Biopolímero VKV₄

El biopolímero VKV₄ bioproducido en el laboratorio de Bioforge, consiste en un polímero tipo elastina estructural que no posee ninguna secuencia bioactiva, y presenta la siguiente secuencia aminoacídica:



El dominio [VPGVG] es el que proporciona en este biopolímero la excepcional biocompatibilidad, además del deseado comportamiento mecánico.

El segundo dominio [VPGKG] es el bloque que permite la posibilidad de modificación química post-traducional del biopolímero, debido a la presencia del grupo amino libre en el radical de la lisina introducida.

La caracterización preliminar del biopolímero mediante diferentes técnicas permite la obtención de los siguientes parámetros:

Temperatura de Transición Inversa (TTI) (pH=8)	54.3 °C
Peso molecular aparente	60647
Punto isoeléctrico (teórico)	11.04
Rendimiento de la producción	96.25 mg/L

Tabla 5.4 Características del VKV₄.

5.1.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en la bioproducción para el crecimiento de las cepas bacterianas de *Escherichia coli* son los siguientes:

- **LB** (Luria-Bertani). Composición por litro: 10 g de NaCl, 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura. Esterilizado en autoclave. Casa comercial Pronadisa.
- **LB-agar**. Composición por litro: medio LB con 1.5% (p/v) de bacto-agar. Esterilizado en autoclave.
- **TBm** (Terrific Bertani modificado). Se prepara en batch de un litro, pesando 50,8 gramos de medio TB (casa comercial Pronadisa), y añadiendo glicerol a una concentración en el medio de 0.8% (v/v) (8 ml), Na₂HPO₄ a 25 mM, KH₂PO₄ a 25 mM, NH₄Cl a 50 mM, Na₂SO₄ a 5 mM, Glucosa al 0.05 % y α-lactosa al 0.2 %.
- **EGM**: medio de cultivo endotelial (Endothelial Cell Growth Medium) de la casa Lonza, utilizado para el cultivo de fibroblastos.

5.2 TÉCNICAS Y MÉTODOS INSTRUMENTALES

5.2.1 Bioproducción y Purificación de ELRs

El proceso de producción del biopolímero VKV₄ se describe en el siguiente diagrama de flujo:

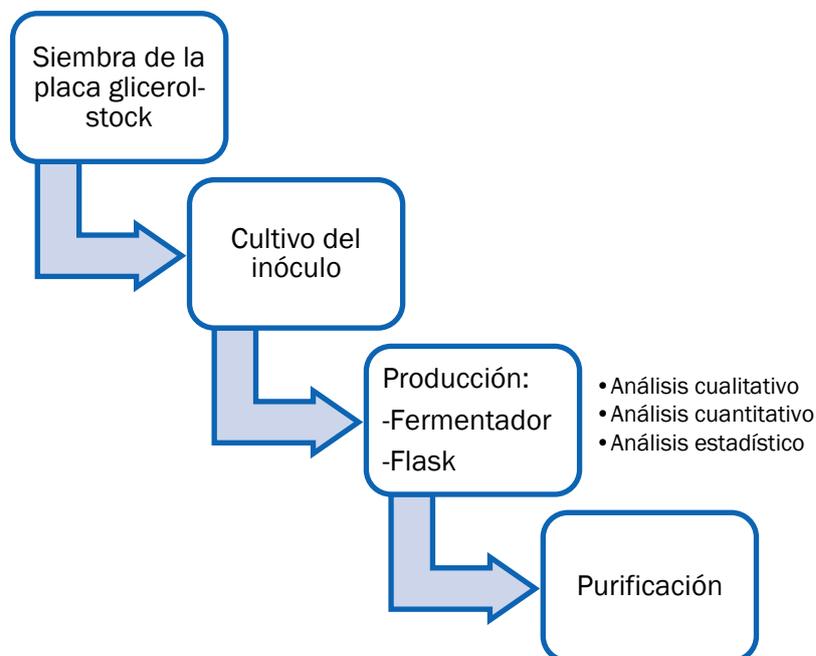


Figura 5.1 Esquema Proceso Producción de biopolímeros tipo elastina.

5.2.1.1 Introducción

Se parte de cepas de *Escherichia coli* modificadas genéticamente en el laboratorio de biología molecular del grupo BIOFORGE.

Estas cepas se conservan, almacenadas en glicerol estéril, en una proporción del 80%, bajo condiciones de temperatura de -80 °C.

5.2.1.2 Siembra de la placa

Se realiza la siembra de la bacteria mediante un asa de platino, en placas Petri grandes, **Figura 5.2**, que contienen 1% de glucosa, como aporte de nutrientes, medio LB-agar, para permitir el crecimiento de las cepas, y el antibiótico ampicilina en una concentración de 100 mg/ml, para el cual la cepa ha adquirido resistencia, buscando inhibir la proliferación de las bacterias no transfectadas. Se llevará a cabo en condiciones asépticas, utilizando siempre la campana de flujo laminar.

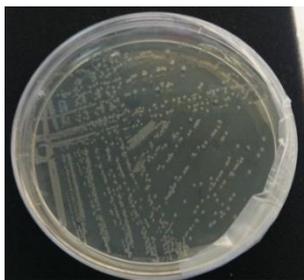


Figura 5.2 Placa Petri con colonias bacterianas en medio lb-agar.

La placa Petri será incubada, para favorecer la proliferación y crecimiento bacteriano a una temperatura de 37 °C durante la noche (O/N).

5.2.1.3 Preparación del inóculo

A continuación, se hace la selección de un mínimo de 8 colonias, lo más aisladas posibles en la placa Petri. Estas colonias se incuban en falcon con 5 ml de medio de cultivo TBm y antibiótico en las mismas condiciones que la placa Petri.

Se realiza un *screening* o cribado de las colonias seleccionadas, con el objetivo de seleccionar aquella cuya bioproducción es máxima. Para ello se realiza un análisis electroforético en gel de poliacrilamida de cada una de las suspensiones celulares.

Los análisis electroforéticos realizados a lo largo de la bioproducción requerirán seguir un protocolo, que consiste en tomar muestras de 20 µl en distintos eppendorf, de cada una de las colonias incubadas, a los que se añadirá 5 µl de Loading Buffer (LB) de color azul para teñir la muestra. Estas muestras serán hervidas durante 5 minutos a 100 °C para desnaturalizar las proteínas y, posteriormente centrifugadas durante otros 5 minutos a 13400 rpm para eliminar los restos menos solubles. De esta forma, las muestras quedan preparadas para ser inyectadas en el gel dentro de la cubeta en que se lleva a cabo la electroforesis (ver **Figura 5.3**).



Figura 5.3 Cubeta utilizada para las electroforesis.

Nota: La composición de las sustancias tamponadas utilizadas a lo largo de la bioproducción se detallan en el apartado 5.1.2 Reactivos y disolventes.

Al finalizar la electroforesis, el gel de poliacrilamida se tiñe mediante Cu(II), de forma que se revelan los caminos en cada una de las calles.

Se selecciona la colonia de mayor producción, aquella cuya banda sea más gruesa en torno al peso molecular del biopolímero que estamos produciendo. Será la que utilizemos para preparar el inóculo.

La producción puede realizarse mediante fermentador, o mediante flask, erlenmeyers. Se realizará una producción en flask, por lo que la colonia seleccionada será incubada en 15 ml de medio LB, 2 ml de glucosa al 1% y 1.5 ml del antibiótico, ampicilina con concentración 100 mg/ml.

5.2.1.4 Crecimiento del inóculo

Se introduce el inóculo en un medio de cultivo con nutrientes suficientes, y con las condiciones externas adecuadas para el crecimiento del microorganismo. Se lleva a cabo un seguimiento de la cantidad de células presentes, la biomasa, a lo largo de las horas de cultivo mediante medida de la densidad óptica de las muestras tomadas.

La medida de la densidad óptica es la determinación de la absorbancia de la muestra a la longitud de 600nm. La absorbancia y la concentración de la muestra se relacionan por la Ley de Lambert-Beer, *apartado 5.2.3.5*.

Con los datos recogidos de estas mediciones, se obtiene una representación gráfica del número de células respecto del tiempo. El patrón de crecimiento bacteriano, mostrado en la **Figura 5.4**.

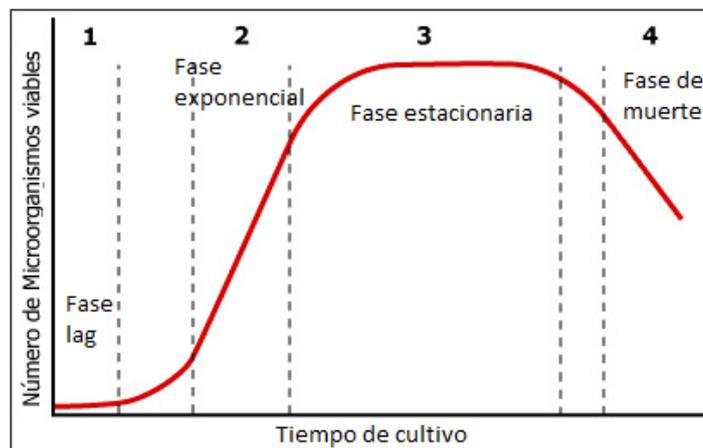


Figura 5.4 Gráfica del crecimiento bacteriano en función del tiempo de cultivo.

Las etapas que se pueden diferenciar en la **Figura 5.4**, quedan claramente definidas:

- **Etapas 1**, denominada “Fase de latencia” o “Fase lag”. Se produce inmediatamente después de la inoculación. En esta primera fase los

microorganismos se encuentran en una etapa de adaptación a las condiciones ambientales y el crecimiento bacteriano es imperceptible.

- **Etapa 2**, denominada “Fase exponencial” o “Fase log”. El crecimiento de los microorganismos sigue un patrón exponencial. Corresponde a la etapa de velocidad de crecimiento máxima para las condiciones utilizadas, al no existir una limitación de nutrientes.
- **Etapa 3**, denominada “Fase estacionaria”. Es la fase en la que no se producen cambios significativos de la cantidad total de microorganismos, puesto que se detiene el crecimiento al agotarse un nutriente.

Existe una fase intermedia denominada “Fase de declinación” o “Fase logarítmica tardía”. Se trata de una fase de decrecimiento, es decir, en la que la producción de masa celular por unidad de tiempo disminuye.

- **Etapa 4**, denominada “Fase de muerte celular”. Se produce la muerte y lisis masiva de forma exponencial del cultivo, como consecuencia del agotamiento de las reservas de energía en el medio.

En el trabajo en laboratorio, al alcanzar el estado estacionario se da por concluida la producción. El objetivo es alcanzarle lo antes posible, puesto que es el momento de máximo número de bacterias y, por tanto, de la mayor producción del biopolímero de interés en las condiciones utilizadas.

Este crecimiento celular máximo, determinado mediante la medida de la densidad óptica, dependerá de múltiples factores tales como la cepa utilizada, la colonia elegida, el tiempo de crecimiento de la colonia, el medio de cultivo utilizado...etc.

El crecimiento celular y la producción de la proteína de interés no tiene por qué ser proporcional, debido a que las condiciones proporcionadas en la fermentación pueden ser óptimas para el crecimiento bacteriano pero no ser adecuadas para la expresión de dicha proteína.

5.2.1.5 Producción bacteriana

La producción y crecimiento bacteriano se puede realizar de las dos formas siguientes:

- Producción en FLASK en condiciones no controladas, **Figura 5.5-a**.
- Producción en FERMENTADOR en condiciones controladas, **Figura 5.5-b**.

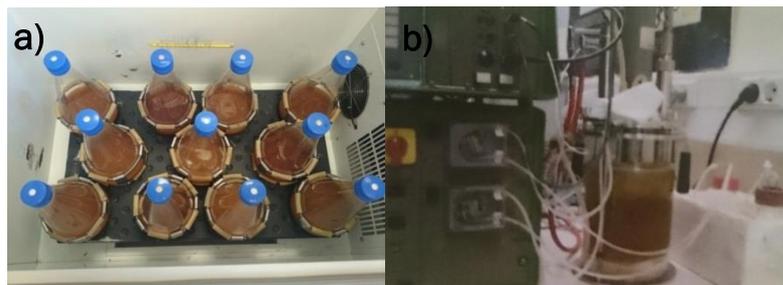


Figura 5.5 a) Producción en flask, mediante Erlenmeyers de plástico en incubadora con agitación orbital, b) Producción en fermentador de 15 L.

Las condiciones que pueden modificarse en la etapa de producción se refieren al cambio de factores de temperatura, pH, oxígeno disuelto en el medio de cultivo, agitación, aireación y volumen de ácido o base adicionado.

El medio de cultivo utilizado para la producción es el medio TBm cuya composición se detalla en el apartado 5.1.4. Se preparan botellas de medio de 2L que serán esterilizadas junto con resto el material utilizado, mediante el autoclavado.

La producción se realizará en flask por lo que las condiciones nombradas previamente no serán controladas, a excepción de temperatura y agitación.

Se preparan 12 erlenmeyers, de 2L de capacidad, con 600 ml del medio TBm preparado, 0.5 ml/l de ampicilina como antibiótico en una concentración de 100mg/ml. El volumen total no debe superar el 20-25% del volumen total del erlenmeyer para asegurar una buena oxigenación del cultivo. Es imprescindible esterilizar todo el conjunto, en autoclave, y después inocular en cada uno de los erlenmeyers 1 ml del inóculo previamente preparado. Estos erlenmeyers se mantendrán en una incubadora, ver **Figura 5.5**, con agitación orbital a 250 rpm y 37°C durante aproximadamente 18-20 horas. El criterio utilizado para estimar el punto final está relacionado con la densidad óptica. Se mide la absorbancia y se estudian los resultados en comparación a otras experiencias anteriores. La densidad óptica en el estado estacionario, según anteriores experiencias, está en valores de absorbancia en torno a 9-10, por lo que valores similares a éste, indicarán que el medio está agotado y se puede concluir la producción.

Tras las 18 horas de incubación de los erlenmeyers, se toman muestras en un intervalo de media hora, con el fin de encontrar la estabilidad en la absorbancia

Tras el proceso de producción en flask, se recogen las células mediante una centrifugación (8000 rpm, 20min, 4°C) y se lavan, dejándolas preparadas para la siguiente etapa de extracción y purificación del biopolímero.

5.2.1.6 Lavado de células

El lavado de células, recogidas en el precipitado de la última centrifugación, se realiza mediante 3 etapas sucesivas de centrifugación y resuspensión de las células en tampón de lavado de bacterias.

Después de cada centrifugación, las células quedarán en el precipitado de tal forma que se elimina el sobrenadante. Se toma una muestra de éste después de cada etapa, para analizar la evolución del lavado. Alcanzando en la última etapa un sobrenadante transparente y sin turbidez.

Tras esta última centrifugación, las células se resuspenden en el denominado tampón de sonicación, dejándolas preparadas para la siguiente etapa de extracción y purificación.

5.2.1.7 Extracción y purificación de recombinámeros tipo elastina, ELRs

Una vez finalizada la bioproducción, es necesario llevar a cabo el proceso de extracción y purificación del polímero de acuerdo a los protocolos y aprovechando sus propiedades físicas y su naturaleza inteligente ante cambios en la temperatura y el pH, ver **Figura 5.6**.

Para la extracción, las células lavadas y resuspendidas en el tampón de sonicación a temperatura de 4 °C son sometidas a un proceso de lisis celular, permitiendo liberar el biopolímero producido. Se adiciona en la suspensión de las células un inhibidor de proteasas (PMSF) (1 µl por ml de tampón de sonicación, 0.1%(v/v)) con el objetivo de evitar la acción de estas enzimas, debido a que podrían actuar sobre el biopolímero producido, degradándolo.

El proceso de ruptura celular se lleva a cabo, a 4°C, mediante un disruptor, en el que se produce una despresurización súbita, esto es, un impacto físico instantáneo que produce la rotura la membrana celular.

El proceso de purificación del biopolímero se lleva a cabo en una serie de etapas sucesivas de calentamiento-enfriamiento y centrifugación, bajo control del pH del medio, ver **Figura 5.6**.

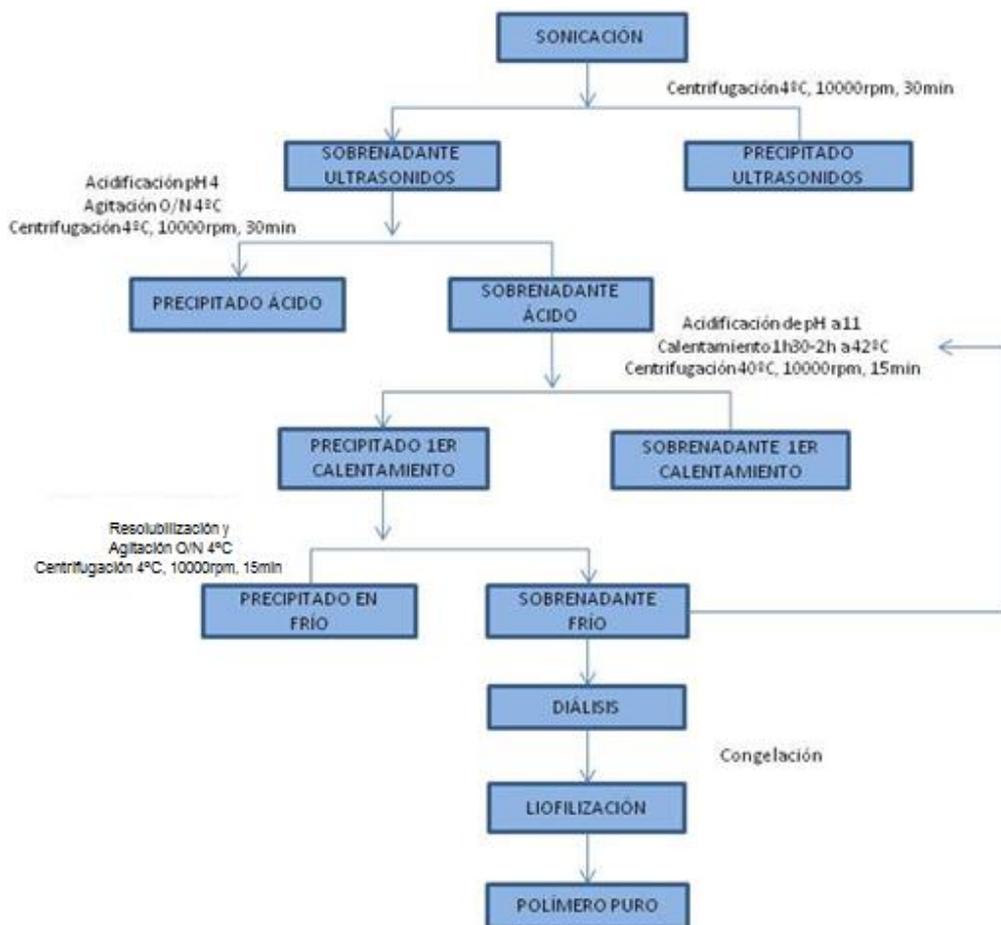


Figura 5.6 Protocolo de purificación del polímero VKV4.

En cada etapa se recogen muestras del precipitado y sobrenadante para analizar la presencia, o no, de polímero en las muestras de cada fase mediante un análisis electroforético. Los precipitados que se van retirando se congelan mientras se realizan los análisis de las muestras, con objeto de recuperar el polímero, en el caso de que no siguiera la ruta esperada.

I. Primera etapa (frío):

La primera etapa, una vez se ha producido la extracción del polímero, consiste en una centrifugación (2000 rpm, 10 minutos, 4 °C) para eliminar la espuma producida en el disruptor. Posteriormente se centrifuga de nuevo en frío (14000 rpm, 30 minutos, 4 °C) con el objetivo de separar la fracción soluble en que se encuentra nuestro polímero.

El precipitado es recogido y congelado, hasta la comprobación de las muestras, mientras que el sobrenadante es acidificado con HCl 0.1M hasta un pH de 4. Se deja toda la noche (OverNight) en agitación y a 4 °C.

II. Segunda etapa (frío y pH ácido):

Al día siguiente, se lleva a cabo la centrifugación (14000 rpm, 20 minutos, 4 °C). Se recoge nuevamente el precipitado, compuesto fundamentalmente por proteínas ácidas desnaturalizadas. El sobrenadante ácido es basificado mediante NaOH 1M hasta un pH de 11.4 y calentado en un baño a 42 °C durante 2 horas.

III. Tercera etapa (caliente y pH básico):

Se realiza una centrifugación en caliente (8000 rpm, 15 minutos, 40 °C). En este caso el polímero se encuentra en el precipitado debido a sus propiedades físicas, ya que posee solubilidad a baja temperatura. El sobrenadante se recoge para analizar si contiene aún algún resto de polímero, mientras que el precipitado se resolubiliza en agua milliQ y en agitación durante toda la noche a temperatura de 4 °C.

IV. Cuarta etapa (frío y pH básico):

Al día siguiente, se produce una centrifugación de la suspensión (14000 rpm, 15 minutos, 4 °C). El sobrenadante obtenido iniciará nuevamente el ciclo de calentamiento, comprobando previamente que el pH se mantiene en un valor aproximadamente de 11. Este ciclo se repetirá, por tanto, dos veces ver **Figura 5.6**.

La purificación termina con el proceso de diálisis con el objetivo de eliminar la presencia de sales que acompañan al polímero, enfrentándolo a agua milliQ, durante 3 cambios de 25l. La disolución acuosa del biopolímero se liofiliza hasta la obtención de un sólido blanco. Se obtiene un producto de aspecto algodonoso que se almacena en botes, ver **Figura 5.7**.



Figura 5.7 Aspecto de polímero obtenido tras la liofilización.

Finalmente el polímero obtenido es congelado a -20 °C para su almacenamiento. Previamente se caracteriza el biopolímero producido mediante las técnicas de DSC, MALDI-TOF, FTIR, RMN, desarrolladas en el apartado 5.2.3 *Caracterización de ELRs*.

5.2.2 Modificación química y purificación de ELRs

Los recombinámeros tipo elastina (ELRs) sintetizados son modificados químicamente mediante la transformación del grupo amino libre de la cadena lateral de las lisinas (K), ver **Figura 5.8**, presentes en su secuencia de aminoácidos.

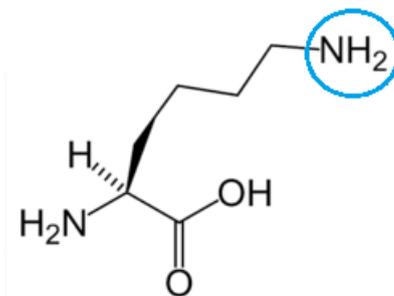


Figura 5.8 Estructura química del aminoácido Lisina (K), con el grupo amino libre señalado.

En la elaboración de este TFG se han llevado a cabo las siguientes modificaciones químicas del polímero VKV₄:

- Biopolímero modificado con fenil azidas (VKV₄-PH-N₃)
- Biopolímero modificado con azidas (VKV₄-N₃)
- Biopolímero modificado con ciclooctino (VKV₄-ciclooctino)

Únicamente el polímero VKV₄-PH-N₃ será utilizado después en la técnica de electrohilado y en la preparación de hidrogeles. Sin embargo, se realizaron también el resto de modificaciones puesto que eran requeridas en ese momento en el laboratorio y me permitía el aprendizaje de la síntesis de esos nuevos compuestos.

5.2.2.1 Protocolo modificación del biopolímero VKV₄ con fenil azidas

Se introduce el grupo fenil azido presente en el ácido *p*-azidobenzoico mediante la reacción de amidación del grupo amino libre en las cadenas de las lisinas del polímero y el grupo carboxilo del ácido, una vez activado como grupo anhídrido. En un mol del polímero VKV₄ existen 24 lisinas, por lo que los equivalentes con que se trabaja se refieren a los milimoles de lisinas.

Se describen a continuación las etapas llevadas a cabo para la modificación de 300 mg de polímero VKV₄.

a) Preparación del anhídrido azidobenzoico.

Sobre una solución de diciclohexilcarbodiimida, DCC, (306.3 mg, 1.4835 mmol, 7.5eq, PM=206,3) en, diclorometano, DCM (6.25 ml) en atmósfera inerte de argón, se añade lentamente ácido 4-azidobenzoico (6 ml, 2,975

mmol, 0,5 M en tert-butil éter) a 4 °C. La reacción se deja en agitación durante tres horas a temperatura ambiente con el fin de conseguir una mejor activación del grupo carboxilo como anhídrido del ácido, ver **Figura 5.9**.

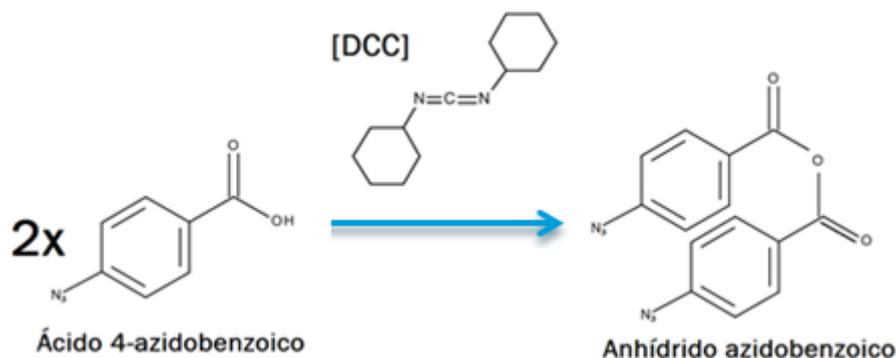


Figura 5.9 Reacción de obtención del anhídrido.

b) Reacción de amidación: Preparación del VKV₄-PH-N₃.

A continuación, se añade la disolución preparada de anhídrido 4-azidobenzoico, mediante una cánula, a una solución del polímero VKV₄ NIP 1090 (500 mg, 0,008245 mmol polímero, 0,1978 mmol lisina, Pm= 60.642) en TFE (13.3 ml) a 4 °C, en atmósfera de argón. La mezcla se mantiene en agitación durante dos días, ver **Figura 5.10**, a temperatura ambiente y en ausencia de radiación luminosa.

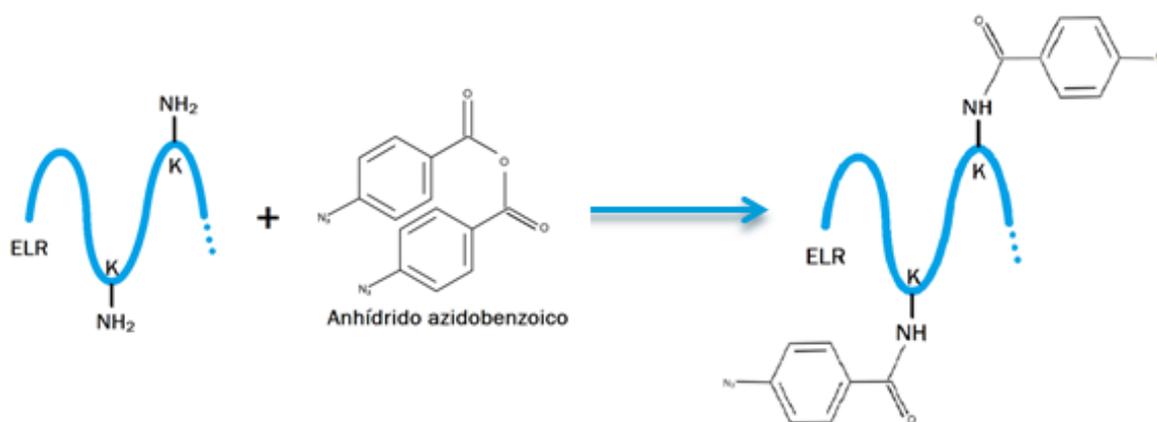


Figura 5.10 Reacción de amidación de las lisinas con el anhídrido azidobenzoico

c) Purificación del VKV₄-PH-N₃

El producto bruto se precipita con éter dietílico (2 x 30 ml) y se lava con acetona (1 x 30 ml). Los precipitados correspondientes se centrifugan (10 minutos, 8500 rpm, 4 °C). La acetona residual es eliminada a presión reducida. Finalmente, el sólido se disuelve en milliQ fría y se purifica por diálisis exhaustiva frente a agua a baja temperatura; después es liofilizado.

Todo el proceso se lleva a cabo en oscuridad o con luz especial debido a la fotosensibilidad del producto por el grupo fenil azido.

5.2.2.2 Protocolo modificación del biopolímero VKV₄ con azidas

Este proceso de modificación química conlleva dos etapas, una primera de síntesis de la azida tríflica y una segunda de preparación del VKV₄-N₃, además de la posterior purificación del polímero obtenido.

Se describen a continuación las etapas llevadas a cabo para la modificación de 1500 mg de polímero VKV₄.

a) Preparación de azida tríflica:

Se disuelve azida de sodio (3870.75mg, 59.55 mmol, 100 eq, PM=65) en agua milliQ (11.4 mL), y una vez disuelta, se adiciona diclorometano, DCM (14.5mL).

Sobre esa disolución, enfriada en baño de hielo, se añade lentamente “gota a gota” anhídrido tríflico (2 mL, 11.91 mmol, 20 eq, d=1.68, Pm= 282.13), ver **Figura 5.11**. Se mantiene en agitación durante un período máximo de 2 horas, de las cuales será 1 hora a 0°C y 1 hora a r.t.



Figura 5.11 Reacción de obtención de azida tríflica.

La fase orgánica de DCM se decanta del crudo de reacción y la fase acuosa es lavada varias veces con DCM. Las fases orgánicas juntas se lavan con una disolución saturada de carbonato de sodio. Finalmente, se obtiene una disolución de azida tríflica en DCM, que se utiliza en la siguiente etapa, sin purificación posterior.

b) Preparación del VKV₄-N₃

Se disuelve el polímero VKV₄ (1500 mg, 0.595mmol_{NH₂}, 1eq) en 18 ml de agua milliQ a 4°C. A esa disolución se le adiciona carbonato de sodio decahidratado sólido (338.63 mg, 1.18 mmol, Pm= 286; 1.13mL de una disolución de 300 mg/ml) y sulfato de cobre (1.99 mg, 0.008 mmol, Pm=249.68; 0.19mL de una disolución de 10 mg/ml). Se añade metanol (1.125 mL) lentamente, en baño de hielo, para evitar precipitados.

Por último se añade gota a gota la disolución de azida triflúrica (11.91 mmol, 100 eq) preparada anteriormente a 4 °C disuelta en diclorometano, y se deja agitando a temperatura ambiente O/N, ver **Figura 5.12**.

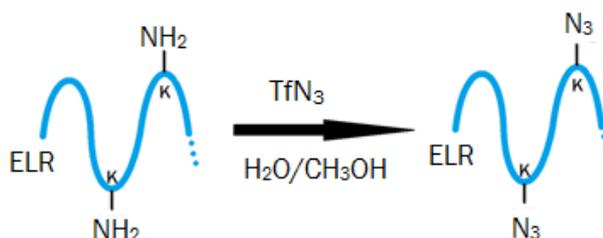


Figura 5.12 Reacción sustitución grupos amino libres del biopolímero con azida triflúrica.

c) Purificación del VKV₄-N₃

El precipitado blanco formado del producto es sometido a presión reducida (p=250 bar) para eliminar el diclorometano y el metanol residual, sin llegar a sequedad (peligro de explosión de los restos de azida de cobre (I)). Se redissuelve el precipitado en 50 ml de agua milliQ a 4 °C. Posteriormente se purifica mediante diálisis contra disolución de urea (5g/L), con dos cambios de esta disolución y 5 de agua. Por último se congela y liofiliza para la obtención del polímero modificado.

5.2.2.3 Protocolo modificación del biopolímero VKV₄ con ciclooctino

Mediante este proceso se introduce un grupo alquilino, como es el ciclooctino, en el polímero VKV₄ x24.

Se describen a continuación las etapas llevadas a cabo para la modificación de 3000 mg de polímero VKV₄.

a) Preparación del VKV₄-ciclooctino

Una solución de (1R, 8S, 9S)-biciclo [6.1.0] non-4-yn-9-ilmetil succinimidil carbonato (0.703mmol, 205 mg, PM 291.30) en DiMetil Formamida (DMF, 2 ml) se añade a una solución de VKV₄ NIP 1152 (2964 mg, 1.173 mmol_{NH2}, 24lys, 1 eq, PM 60642) en DMF (35 mL) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, ver **Figura 5.13**. La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas.

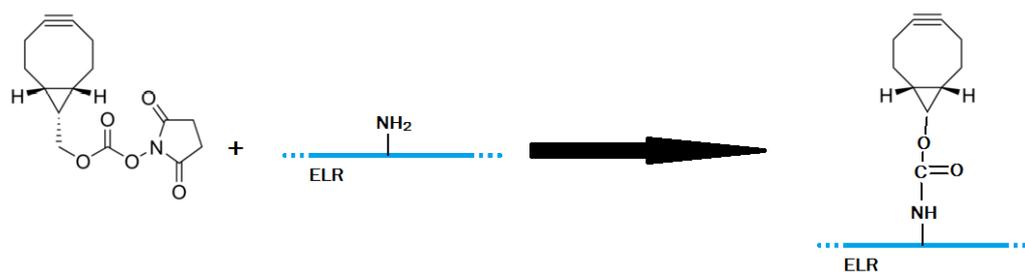


Figura 5.13 Reacción de amidación de los grupos amino libres del biopolímero con un derivado de ciclooctino

b) Purificación del VKV₄-ciclooctino

Después de este tiempo, 60 mL de Et₂O se añaden a la mezcla, apareciendo un precipitado blanco del polímero insoluble. Se centrifuga a 10000 r.p.m. durante 10 minutos, a 4°C. El sobrenadante se elimina y el sólido se lava con acetona (3x15 mL), se seca a presión reducida, se redissuelve en agua MilliQ (4 ° C, 30 mL), se dializa frente a agua MilliQ (3x25 L) y se liofiliza.

5.2.3 Caracterización de ELRs: bioproductos y modificados químicamente

Se lleva a cabo la caracterización de los productos bioproductos y de los posteriormente modificados, cumplimentando la correspondiente ficha del polímero con los datos y los resultados obtenidos de las siguientes técnicas: espectroscopía de infrarrojo (FTIR), resonancia magnética nuclear (RMN), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía de masas (MALDI-ToF).

5.2.3.1 Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)

La espectroscopía de infrarrojo es la técnica utilizada para la identificación de los grupos funcionales que conforman un compuesto.

Al absorber una molécula la radiación infrarroja, se produce un aumento de la intensidad de la vibración intermolecular que posee una frecuencia igual a la irradiada, lo que genera señales con frecuencias que se corresponden con la vibración de un enlace específico. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa, por tanto, de los tipos de enlaces y grupos funcionales presentes [85].

Esta técnica se caracteriza por ser, dentro de las técnicas espectroscópicas, una de las más versátiles y de mayor aplicación en la caracterización e identificación de materiales, ya que permite el análisis no destructivo de muestras en estado sólido y líquido, con requerimientos

mínimos de cantidad de muestra y con completa reproducibilidad de los mismos [85].

Dentro de la espectroscopía de infrarrojo, se ha utilizado específicamente la técnica FTIR-ATR, esto es Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada.

Mediante la técnica de la Transformada de Fourier, se aplica una operación matemática que convierte el espectro obtenido en el dominio del tiempo en un espectro correspondiente al dominio de la frecuencia.

FTIR identifica los enlaces químicos en una molécula mediante la producción de un espectro de absorción de radiación infrarroja. Los espectros representan un perfil de la muestra, es decir una huella digital molecular distintiva del resto de moléculas con componentes diferentes [86].

Se utiliza la técnica de FTIR a menudo para complementar a otras como RMN, proporcionando datos complementarios significativos respecto a la estructura de la macromolécula de un polímero [86].

El espectrómetro de infrarrojo utilizado en el laboratorio es el mostrado en la **Figura 5.14**, modelo Tensor 27, de la casa comercial Bruker. El software a través del cual se computan los espectros es OPUS (Mattson Instrument).



Figura 5.14 Espectrómetro de infrarrojo Bruker Tensor 27.

En el presente TFG esta técnica se utilizó para la caracterización polimérica, detectando los grupos funcionales de estas macromoléculas mediante un recorrido de un mínimo de 64 scans entre un intervalo de 600 a 4000 cm^{-1} . Uno de los grupos de mayor interés en los polímeros utilizados en el desarrollo de este TFG es el grupo azido que se muestra en el espectro mediante un pico de absorbancia a 2100 cm^{-1} .

5.2.3.2 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear, más comúnmente conocida como espectroscopía NMR ('Nuclear Magnetic Resonance', en inglés), es una técnica de investigación que explota las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos. Se determinan las propiedades físicas y químicas de los átomos o las moléculas en los que están contenidos. Se basa en el fenómeno de la resonancia magnética nuclear y puede proporcionar información detallada sobre la estructura, la dinámica, el estado de reacción y el entorno químico de las moléculas [87].

Los espectros NMR proporcionan gran información, son muy singulares, claros, analíticamente tratables y a menudo altamente predecibles para moléculas pequeñas y simples.

Así la espectroscopia de RMN es usada por químicos y bioquímicos para investigar las propiedades y estructuras de las moléculas orgánicas, aunque es aplicable a cualquier tipo de muestra que contenga núcleos con un número impar de protones más neutrones, ya que éstos presentan un momento magnético y un momento angular intrínseco y, por consiguiente, tendrán un espín no nulo mayor que cero. Así, las muestras oscilan desde pequeños compuestos analizados con protón unidimensional o espectroscopía de carbono-13, a grandes proteínas o ácidos nucleicos utilizando técnicas tridimensionales [87-89].

El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del spin nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos. Así, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un núcleo determinado están íntimamente relacionadas con su estructura molecular, por lo que un análisis detallado del espectro proporciona valiosa información acerca de la estructura del compuesto que lo origina [88].

Generalmente la muestra estará disuelta, entonces la gran mayoría de átomos de una solución pertenecen al disolvente y la mayor parte de disolventes comúnmente utilizados son hidrocarbonados, conteniendo protones sensibles al RMN. Así pues, será necesario el uso de disolventes deuterados en los que los protones (+99%) han sido sustituidos por deuterio (^2H). El deuterocloroformo (CDCl_3) es el disolvente deuterado empleado por excelencia aunque, no obstante, para analitos hidrofílicos se prefiere el óxido de deuterio (D_2O) y el DMSO deuterado (DMSO-d_6) [88].

Los ELRs se disuelven en DMSO deuterado para garantizar la total solubilidad del polímero. Aunque también son solubles en agua deuterada fría, no se realizan en este disolvente para evitar la transición a temperatura ambiente que se produciría en disolución acuosa.

El equipo empleado en la elaboración de este TFG es el mostrado en la **Figura 5.15**, modelo NMR 400, de la casa comercial Agilent Technologies, perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Uva (LTI). Para la representación de las señales se utiliza el software MestReNova (Versión 7.0.1, Mestrelab Research S.L.), la integración de las señales, permite determinar la conversión alcanzada tras una modificación química del ELR.



Figura 5.15 Equipo NMR 400 de Agilent Technologies.

5.2.3.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) mide las temperaturas y los flujos de calor asociado con transiciones térmicas en un material. Es una técnica termoanalítica en la que la diferencia en la cantidad de calor requerido para el incremento de temperatura de una muestra y una referencia es medida en función de la temperatura. Se determina la diferencia de flujo calorífico en procesos endotérmicos, de absorción de energía, cuya muestra requerirá un aporte mayor de energía que la referencia y exotérmicos, de liberación de energía, en los que la muestra requerirá menor energía que la referencia para alcanzar la temperatura [90, 91].

Las aplicaciones en que se utiliza esta técnica son por tanto para determinar temperatura de fusión, calor de fusión, calor latente, energía de reacción temperatura de transición vítrea, temperatura de transición de fase, temperatura de precipitación, temperatura de desnaturalización y el calor específico entre otros [90].

La Temperatura de Transición Inversa (TTI) característica de los polímeros tipo elastina es determinada entonces mediante la Calorimetría Diferencial de Barrido. En resumen, la técnica consiste en introducir 20 μl de una muestra de concentración 50 mg/ml, dentro de un crisol de aluminio estandarizado de Mettler Toledo, y colocarla en el interior del instrumento DSC, junto con otro crisol que contiene 20 μl de la referencia, es decir el disolvente en que se ha disuelto la muestra.

Ambos crisoles sufren rampas de enfriamiento y calentamiento según el programa de temperaturas especificado, de forma que tanto muestra como referencia tendrán la misma temperatura en cada momento.

En los experimentos llevados a cabo en el laboratorio la muestra experimentará una transición endotérmica de fase a la temperatura de transición característica, absorbiendo una fracción de la energía proporcionada en esta transición, por tanto será necesario un aporte adicional de calor para mantener la misma temperatura en la muestra y la referencia. Esa temperatura es denominada TTI siendo el valor del pico mínimo observado en las gráficas de resultados, ver ejemplo en **Figura 5.16**.

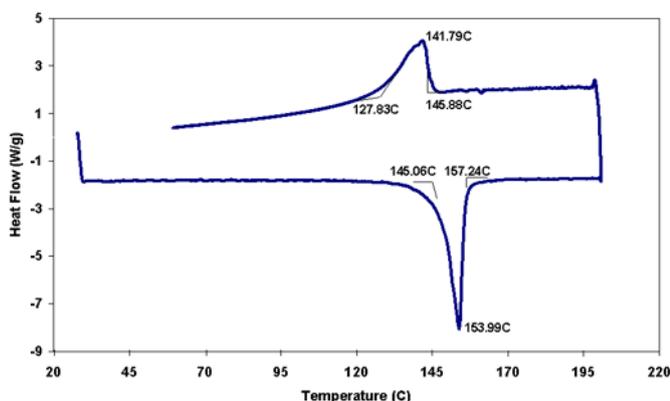


Figura 5.16 Curva inferior del gráfico DSC corresponde a la endoterma, resultante de calentar la muestra a una determinada velocidad. La curva superior corresponde a la exoterma, al enfriar la muestra [90].

El equipo utilizado en el laboratorio en la caracterización de polímero mediante la Temperatura de Transición Inversa (TTI) es el mostrado en la **Figura 5.17**, modelo 822^e, de la casa comercial Mettler Toledo, equipado con un controlador de temperatura refrigerado con nitrógeno líquido.



Figura 5.17 Equipo de DSC Mettler Toledo 822^e (izquierda) y soporte donde se colocan los crisoles de muestra y referencia dentro del equipo (derecha).

5.2.3.4 MALDI-ToF

MALDI-ToF hace referencia a la espectroscopía de masas por tiempo de vuelo con ionización por desorción con láser asistida por matrices. (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), Time-Of-Flight (ToF)).

Es la técnica utilizada para determinar el peso molecular absoluto de los polímeros sintéticos. El principio general de esta espectroscopía de masas es una ionización suave y la separación y detección de esos iones en fase gaseosa.

La muestra es embebida en una estructura sólida cristalina generalmente de pequeños componentes orgánicos, dependiendo de la muestra a analizar. Esta matriz absorbe la radiación del láser y es la responsable de la transferencia del analito a la fase gaseosa sin tensión térmica. La matriz debe poseer los siguientes requerimientos: (I) alta absorción electrónica a la longitud de onda del láser, (II) buena estabilidad de vacío, (III) buena solubilidad en disolventes orgánicos que puedan también disolver el analito, (IV) buena miscibilidad con el analito en estado sólido [92, 93].

Durante el proceso de análisis, un rayo láser irradia el cristal durante un nanosegundo, produciendo esa energía una descomposición estructural del cristal y generando una nube de partículas, extrayendo los iones excitados mediante la aplicación de un campo eléctrico. Los iones son acelerados a través de un campo eléctrico a través de un camino libre, para ser detectados. Las masas de los iones son calculadas (relación masa/carga m/z) mediante la medida del tiempo de vuelo, ToF, que es función de la masa de las moléculas [92, 93].

Contrariamente al MALDI de biopolímeros, la ionización final de polímeros sintéticos es normalmente por cationización en lugar de protonación [94].

El espectrómetro de masas empleado para la determinación de pesos moleculares, a partir de muestras de 1 mg de polímero, en este TFG es el

mostrado en la **Figura 5.18**, modelo Autoflex, de la casa comercial Bruker, perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Uva (LTI).



Figura 5.18 Espectrómetro de masas Bruker Autoflex.

5.2.3.5 Espectroscopía UV-Vis

La espectrometría UV-Vis o espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible, cuya longitud de onda está comprendida entre 160 y 780 nm, por una molécula.

La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia, son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se correlacionan con los distintos tipos de enlace presentes en un compuesto. Debido a ello, la espectroscopía UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula. Las bandas que aparecen en un espectro UV-Vis son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas [95, 96].

La Ley de Lambert-Beer es el resumen de las leyes de Beer y de Lambert que permiten relacionar la fracción de radiación absorbida a su paso por una disolución con la concentración del analito y el espesor del medio. Se rige según la ecuación:

$$A = \log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot x$$

Siendo A = absorbancia; I/I_0 = transmitancia; ε = absortividad molar; c = concentración; x = espesor [96].

El espectrómetro UV-Vis se compone de una fuente de radiación que proporciona luz policromática de un rango del espectro (UV, Vis, IR), un

monocromador, red de difracción o filtro de una longitud de onda determinada, la cubeta de soporte de la muestra y un fotodetector [96].

Entre las aplicaciones más comunes de esta técnica destacan la determinación de grupos funcionales en moléculas orgánicas, el análisis de muestras bioquímicas, la determinación de metales en compuestos de coordinación, análisis de semiconductores, determinaciones cuantitativas, etc [95].

El espectrómetro UV-Vis utilizado en el laboratorio es el mostrado en la **Figura 5.19**, modelo Cary 50 Scan UV-Visible, de la casa comercial Agilent Technologies.



Figura 5.19 Espectrómetro de UV-Vis de Agilent Technologies.

5.2.4 Electrohilado: síntesis de nanofibras

El trabajo realizado consiste en el estudio del proceso de electrohilado así como de las variables que afectan en la producción de micro y nanofibras a partir de recombinámeros tipo elastina producidos en los laboratorios del G.I.R. Bioforge.

El polímero utilizado en la elaboración de este TFG es el VK-PH-N₃, siendo utilizado también el polímero HRGD6 para empezar a tomar contacto con la técnica. Con el HRGD6 se hacen los experimentos oportunos a fin de establecer un rango de operación de las condiciones óptimas a aplicar con el biopolímero VK-PH-N₃, debido a que son polímeros con características similares.

5.2.4.1 Descripción del equipo

El equipo utilizado para la técnica de electrohilado consiste en una bomba impulsora, una fuente de alto voltaje y una caja de metracrilato aislante que contiene el colector, según el esquema de la **Figura 5.20**.

La disolución se carga previamente en una jeringuilla, la cual se coloca y sujeta en la bomba impulsora. La jeringa conecta con la aguja, situada en la uno de los agujeros de la caja, por medio de un tubo capilar. Este capilar será

recubierto por papel y aluminio en el caso de trabajar con polímeros fotosensibles. La fuente de alta tensión tiene tres electrodos, dos de ellos conectados a la aguja y al colector, y un tercero a tierra. Se puede regular la altura del colector dentro de la caja mediante soportes.

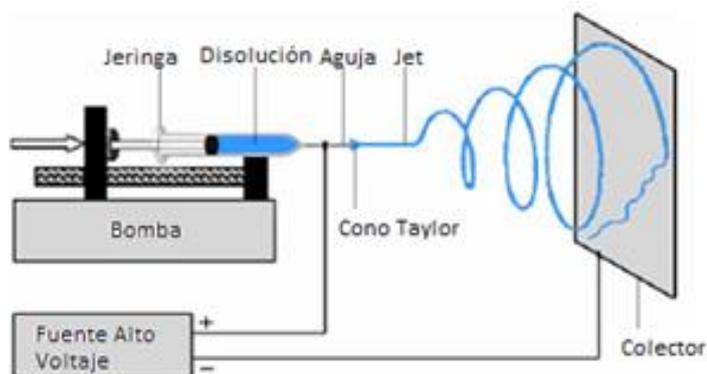


Figura 5.20 Esquema del montaje de la técnica de electrohilado.

En la técnica de electrohilado el montaje puede ser horizontal o vertical, ver **Figura 5.21**. En el caso de la posición horizontal se elimina la posibilidad de goteo del disolvente en el colector dando lugar a defectos, sin embargo la posición vertical favorece la salida de disolución por la aguja debido al efecto de la gravedad.

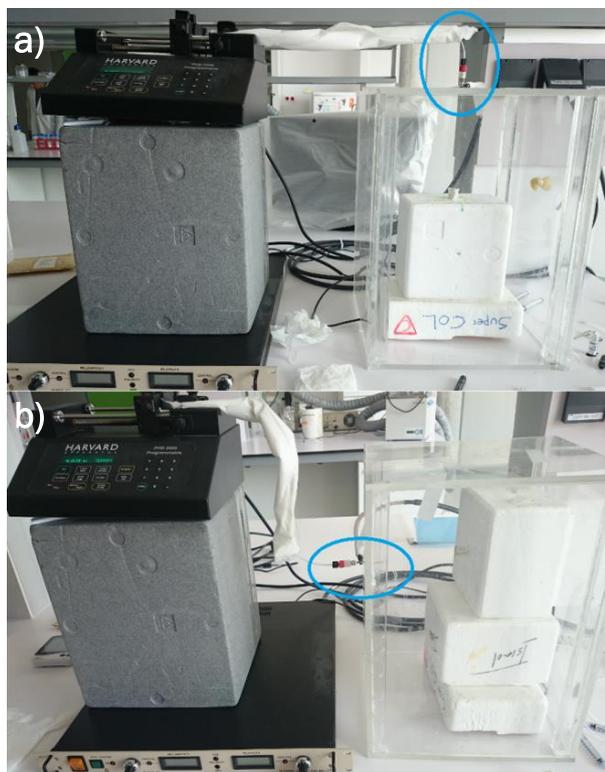


Figura 5.21 a) Montaje vertical, b) montaje horizontal, señalado en azul la posición de la aguja

A continuación se describen cada uno de los equipos y elementos utilizados en la práctica:

- **Bomba de Flujo**

La bomba de infusión utilizada es de la marca comercial, PHD 2000 (Programmable Harvard Apparatus) mostrada en la **Figura 5.22**, con caudales de [0.0001 μ l/min, 220.82 ml/min].



Figura 5.22 Bomba de flujo para electrohilado PHD 2000.

- **Fuente de alto voltaje**

La fuente utilizada es el modelo de la marca comercial FC Series 120 Watt Regulated High Voltage DC Power Supplies, mostrado en la **Figura 5.23**, con potenciales de 1 a 60 kV.



Figura 5.23 Fuente de alto voltaje para electrohilado de FC Series.

- **Caja aislante y colector**

Caja aislante de metacrilato mostrada en la **Figura 5.24-a**, y el colector utilizado es una lámina de ITO (óxido de Indio dopado con estaño) de resistividad 60 Ω y dimensiones (1ft x 1ft x 1mil) en la **Figura 5.24-b** y superficies de vidrio de 18 mm de diámetro.

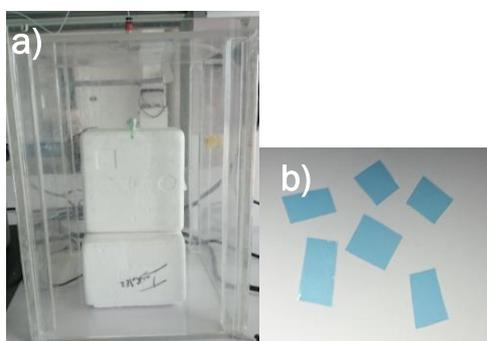


Figura 5.24 a) Caja aislante de metacrilato con cajas de soporte del electrodo b) Superficies de ITO, utilizadas como colector en electrohilado.

▪ Jeringuillas, capilares y agujas

El circuito que contiene la disolución polimérica está formado por los siguientes componentes, ver **Figura 5.25**:

- Jeringa: 1 ml.
- Tubo capilar: $\phi_{\text{int}}=1.9$ mm, $\phi_{\text{ext}}=2.7$ mm.
- Aguja metálica: $\phi_{\text{int}}=0.8$ mm, $\phi_{\text{ext}}=1.25$ mm
- Conectores para el capilar con la aguja y con la jeringa.

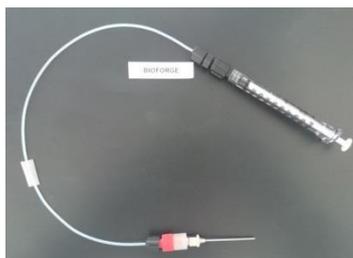


Figura 5.25 Montaje completo de aguja, conector, capilar, conector y jeringa

5.2.4.2 Preparación de la muestra y del equipo

En primer lugar se fija la concentración polimérica de trabajo para la experiencia, es decir una de las variables importantes del proceso de electrohilado. Este parámetro tendrá influencia en la morfología y diámetros de las fibras obtenidas como resultado.

Se prepara entonces la disolución del polímero VKV₄-PH-N₃ en el disolvente seleccionado para las experiencias, en este caso TFE. Se elige el trifluoroetanol por tres motivos: el polímero es muy soluble en TFE, y se produce la disolución de forma instantánea; en segundo lugar, su tensión superficial es la tercera parte de la del agua, lo cual favorece la formación de fibras; y en tercer lugar, en disolventes orgánicos no se produce la transición de fase del polímero con la temperatura, lo que nos permite trabajar a temperatura ambiente. Si el disolvente utilizado fuese agua sería necesario trabajar a temperaturas específicas, por debajo de la transición del biopolímero.

Se prepara 1 ml de disolución en un eppendorf de ámbar para evitar la entrada de luz y justo antes del ensayo debido a la disolución instantánea.

La disposición consiste básicamente en conectar la jeringa con el tubo capilar y la aguja, por medio de los conectores, y cargar en la jeringa la disolución polimérica, previamente preparada en el eppendorf. La carga se lleva a cabo de forma manual, resultando más sencillo que mediante la opción de Refill que proporciona la bomba. En esta etapa la dificultad radica en la fotosensibilidad del polímero utilizado, lo que implica realizar el proceso

de carga en oscuridad, utilizando como fuente de iluminación únicamente una bombilla de luz roja como en la **Figura 5.26**.



Figura 5.26 Disolución del polímero fotosensible, y carga del mismo dentro de la jeringa.

Una vez cargada la jeringa con la disolución, se envuelve el capilar y la jeringa en papel para evitar la entrada de luz, colocando finalmente la jeringa directamente sobre la bomba impulsora. La posición de trabajo es horizontal o vertical en función de la dirección de la aguja dentro de la caja seleccionada para el experimento.

Los electrodos de la fuente de tensión se conectan, uno en la aguja de salida de la disolución y el otro en el colector, de forma que se cree una diferencia de potencial en esa distancia. Como colector de las nanofibras formadas se coloca un trozo de ITO antes de cada experiencia.

5.2.4.3 Determinación de variables y parámetros

Previamente a la puesta en funcionamiento, es necesario haber establecido los parámetros de trabajo para cada experiencia a realizar. Estos parámetros son el voltaje aplicado, la distancia colector-aguja, velocidad de flujo, concentración de la disolución, diámetro de aguja utilizada y orientación del equipo (vertical y horizontal). Estas variables serán modificadas en las diferentes experiencias con el fin de hallar los mejores rangos o valores de operación.

5.2.4.4 Experimentación: Producción de microfibras y nanofibras

Una vez está todo preparado y fijado, se pone en marcha la bomba con la velocidad deseada, en el modo de impulsión. Es importante comprobar que la aguja no está taponada y que el flujo sale correctamente para poder aplicar el potencial fijado.

Este voltaje puede ser corregido inicialmente hasta conseguir la formación del cono de Taylor, evitar que se produzca la caída de gotas o incluso ver directamente la formación de hilos.

PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA

En primer lugar se utiliza el polímero HRGD6 (NIP 1083) para el aprendizaje y la familiarización con la técnica de electrohilado. Se utiliza este polímero debido a que presenta características similares con el biopolímero fotosensible, que queremos hilar y posteriormente entrecruzar con la luz para formar fibras insolubles en agua.

Inicialmente, partiendo de valores de experiencias anteriores, se opera, con este polímero, realizando barridos en las variables importantes de caudal, potencial, distancia y tiempo del electrohilado buscando ajustar a los valores más favorables en la formación de fibras. Estos barridos y ajustes no se detallan en este apartado sino que se explican más adelante en el apartado de resultados 6.5.1 ilustrándolos mejor mediante las imágenes del microscopio.

Se establecen las conclusiones oportunas a partir de esos resultados y los cambios realizados en los parámetros para obtener las relaciones contempladas en la bibliografía, en el apartado 4.4.3.

ELECTROHILADO DEL BIOPOLÍMERO FOTOSENSIBLE: VKV₄-PH-N₃

Tras la etapa de aprendizaje, se trabaja con unos rangos de condiciones obtenidos a partir de los valores más óptimos en la obtención de fibras en la etapa anterior con el polímero HRGD6.

En primer lugar se preparan superficies recubiertas de fibras del polímero sin modificar, VKV₄. Una vez determinadas las condiciones óptimas, se trabaja con el polímero fotosensible modificado con grupos fenilazido, VKV₄-PH-N₃, preparando superficies recubiertas de fibras en las mismas condiciones. De la misma manera que antes, todo el procedimiento experimental llevado a cabo hasta la obtención de nanofibras en óptimas condiciones, se detalla e ilustra en el apartado de resultados 6.5.2.

Se sintetizan ambos tipos de fibras con el fin de establecer una comparación posterior del comportamiento de ambas superficies, utilizando las de VKV₄ como control.

Las superficies recubiertas producidas, tanto de vidrio como de ITO, se almacenan en placas Petri de vidrio y envueltas en aluminio para su posterior utilización y caracterización, ver **Figura 5.27**.

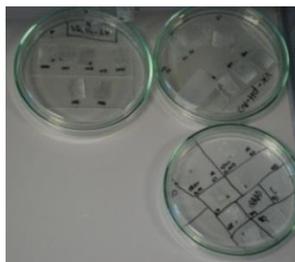


Figura 5.27 Almacenamiento de las superficies recubiertas en placas de vidrio.

5.2.5 Entrecruzamiento del polímero fotosensible

El polímero químicamente modificado con el grupo fenilazido, reacciona en presencia de luz UV a través de dichos grupos fenilazido para dar grupos fenilazobenceno que sirven de entrecruzante de los polímeros, de manera que se producen geles con estructuras entrecruzadas.

Es necesario en primer lugar, la determinación de la longitud de onda a la que absorbe el polímero VKV₄-PH-N₃ mediante espectroscopía UV-Vis, con objeto de irradiar las muestras a esa longitud en la que el pico de absorción es máximo y se reduce el tiempo de exposición necesario.

5.2.5.1 Preparación de la muestra

Las muestras preparadas para el fotoentrecruzamiento son las siguientes:

- Superficie recubierta con nanofibras de VKV₄-PH-N₃, ver **Figura 5.28-a-b**.
- Pastilla de hidrogel formada en un molde de teflón a partir de 600 μL de VKV₄-PH-N₃, ver **Figura 5.28-c**.

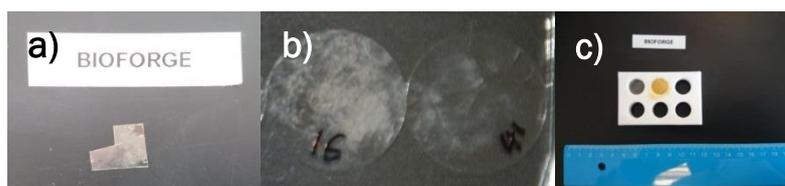


Figura 5.28 a) Superficies de ITO y b) de vidrio recubiertas de nanofibras mediante electrohilado, preparada para irradiación, c) Muestra en molde de teflón.

5.2.5.2 Irradiación con luz UV-Vis

El equipo utilizado en el laboratorio para la irradiación de las muestras es el mostrado en la **Figura 5.29**, con los siguientes componentes:

- Lámpara Ushio USH200DP.
- Soporte de lámpara, 66901 serial N° 120, Oriel Instruments.
- Generador de potencia, 68910 serial N° 113, Oriel Instruments.

- Filtro de la casa Mercury Line Filter, de absorción pasabanda centrado entre 200 y 400 nm.
- Sistema de refrigeración: compuesto de una pequeña bomba que hace circular el agua pasando a través de la lente del soporte.
- Sistema de ventilación: formado por una manguera que extrae hacia la ventana mediante un ventilador el ozono tóxico generado por la lámpara.

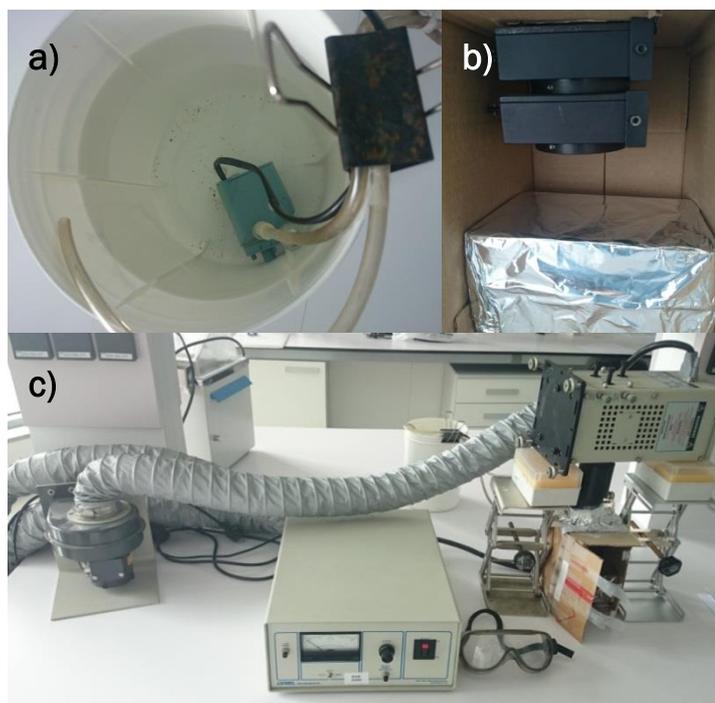


Figura 5.29 c) Equipo utilizado para la irradiación Ultravioleta de muestras. Componentes de izquierda a derecha: sistema de ventilación, fuente de potencia, a) sistema de refrigeración, gafas de protección, b) lámpara con su soporte y caja para colocar la muestra.

En primer lugar se coloca dentro de la lámpara UV el filtro adecuado en función de la longitud de onda de luz que queremos irradiar, en este caso entre 200 y 400 nm. Después se introduce la muestra a irradiar en el interior de la caja de cartón a unos 5-6 cm de la lámpara.

Se pone en funcionamiento la bomba de refrigeración de la lámpara, sumergida en agua destilada fría, y el sistema de ventilación del O_3 generado, con la manguera de evacuación en la ventana.

Finalmente se enciende el generador y se ajusta la potencia a 190 W, iniciándose la irradiación de la muestra. Es importante colocar correctamente la muestra bajo el haz de luz, mediante un folio blanco que nos permita visualizar este haz, siempre con la utilización de las gafas de protección.

Mediante este haz de luz UV se produce el fotoentrecruzamiento irreversible de los polímeros debido a la presencia de los grupos fenilazido, los cuales forman el grupo fenilazobenceno en presencia de luz ultravioleta, tanto en las nanofibras como en los geles en forma de pastillas preparados.

5.2.6 Caracterización de nanofibras

La caracterización de las nanofibras entrecruzadas producidas se lleva a cabo por medio de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM), test del agua, ángulo de contacto y cultivos celulares.

5.2.6.1 Microscopía óptica

Los microscopios son instrumentos diseñados para producir imágenes visuales o fotográficas ampliadas de objetos pequeños. El microscopio debe cumplir tres tareas: (I) producir una imagen ampliada de la muestra, (II) separar los detalles de la imagen, (III) hacer que los detalles sean visibles al ojo humano o la cámara [97].

Los microscopios compuestos modernos funcionan con una doble etapa de diseño de aumento que incorpora una lente de imagen principal, la lente objetivo, acoplada a un sistema de lentes de visualización secundario conocido como el ocular montados en los extremos opuestos de un tubo del cuerpo. La lente objetivo es la responsable de la formación de la imagen principal a diferentes aumentos, mientras que el ocular se utiliza para observar la imagen creada por el objetivo. Los microscopios avanzados actuales cuentan con numerosos sistemas ópticos diferentes [97].

El microscopio óptico es el instrumento utilizado para visualizar en cada experiencia las estructuras formadas en el proceso de electrohilado y su distribución por todo el colector. El microscopio óptico utilizado en el laboratorio es el modelo Eclipse 80i de la casa comercial Nikon, mostrado en la **Figura 5.30**, que cuenta además con una cámara acoplada, para poder registrar digitalmente las imágenes obtenidas.



Figura 5.30 Microscopio óptico Nikon Eclipse 80i.

5.2.6.2 Test del agua

Es un test simple que consiste únicamente en sumergir en agua fría durante varias horas la superficie con las nanofibras sintetizadas por electrohilado, ver **Figura 5.31**. Estas fibras han sido irradiadas mediante luz UV, con lo que debido al carácter fotosensible del polímero modificado, se han entrecruzado alcanzando un estado de gel. El gel entrecruzado es insoluble en agua fría, por lo que el objetivo de esta prueba es comprobar si se han entrecruzado totalmente las fibras.



Figura 5.31 Placa Petri con 4 superficies, recubiertas por fibras, sumergidas en agua a 4°C y almacenadas en un frigorífico.

Entonces, en el caso de que el polímero se haya entrecruzado correctamente, las fibras no se disolverán en agua fría y al secarlas mediante una estufa a 37°C seguirán estando recubiertas. Sin embargo, si no ha habido gelificación, las fibras del polímero se disolverán de nuevo en el agua fría, quedando la superficie de ITO limpia de fibras.

5.2.6.3 Cultivo celular

Se lleva a cabo el proceso de electrohilado en superficies de vidrio, de 18 mm diámetro, con el objetivo de realizar cultivos celulares sobre esas superficies en el interior de placas de 12 pocillos, ver **Figura 5.32**.



Figura 5.32 Placa de pocillos con superficies de vidrio recubiertas de fibras en su interior.

Las células empleadas para el cultivo son fibroblastos humanos debido a la gran capacidad de adhesión mostrada en contraste con otras líneas

celulares. Son células comunes del tejido conjuntivo, encargadas de la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular, con una gran capacidad de diferenciación. Presentan forma alargada fusiforme, citoplasma basófilo y núcleo elíptico.

Inicialmente, se esteriliza el conjunto con el fin de garantizar las condiciones asépticas para el desarrollo de las células. Se establecen además las condiciones necesarias de incubación 37°C y 5% de CO₂ y 95% de aire.

Los cultivos realizados en 200 µl de medio EGM, son de una densidad de 1000 células por superficie y tienen como objetivo demostrar la citocompatibilidad entre las superficies recubiertas de nanofibras poliméricas y las células. Para ello se evalúa la viabilidad celular tras 48 horas de cultivo, observando las muestras mediante microscopía óptica.

Tras 48 horas de cultivo, se fijan las células durante 10 minutos con paraformaldehído y permeabiliza con una solución de 0.5 % Tritón X-100 en PBS/0.1 % BSA. La F-actina presente en el citoplasma celular se tiñe con Faloidina-Alexa Fluor488 y el núcleo con 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Todos los pasos de tinción están seguidos de un exhaustivo lavado con una solución PBS/ 0.1% BSA. Las inspecciones celulares se realizan con un microscopio de fluorescencia invertido, Nikon Eclipse Ti.

El proceso de adhesión celular sobre una superficie consta de dos etapas, la adhesión pasiva, controlada por combinaciones de interacciones físico-químicas entre la membrana celular y la superficie (hidrofóbicas, Van der Waals, coulombicas) y la adhesión activa, que involucra procesos metabólicos celulares que dan lugar a un cambio en la morfología, ver **Figura 5.33**. Esta última es mediada por los ligandos de las integrinas, proteínas intermembrana que se unen a motivos de adhesión, como el RGD, presentes en las proteínas extracelulares. La morfología redondeada y brillante de las células se transforma en extendida y oscura durante el proceso de adhesión.

Mediante el cultivo celular se evalúa la citocompatibilidad de las superficies y la adhesión celular con las fibras de VKV₄-PH-N₃ que no presentan un dominio para la adhesión activa.

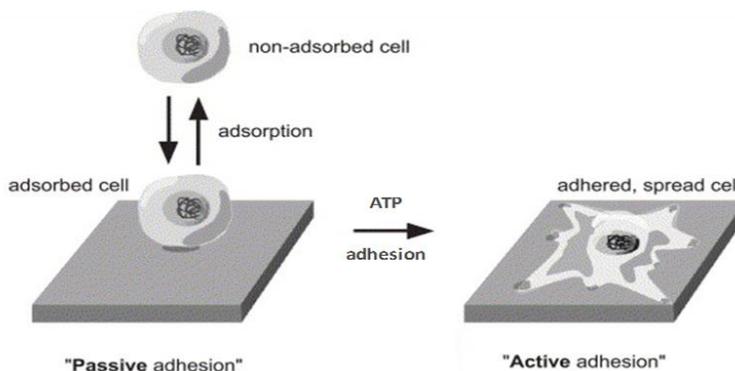


Figura 5.33 Mecanismo de adhesión celular pasivo y activo.

5.2.6.4 Ángulo de contacto

El uso del goniómetro permite realizar mediciones del ángulo que se forma entre una gota de líquido, en este caso agua milliQ, y una superficie sobre la que es depositada.

El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido. Cuando las fuerzas adhesivas son muy grandes en relación con las fuerzas cohesivas, el ángulo de contacto es menor de 90 grados, dando como resultado que el líquido se expanda sobre la superficie.

Una gota de agua depositada sobre una superficie, permite realizar una distinción entre superficies hidrofóbicas, que muestran ángulos de contacto elevados, y superficies hidrofílicas, que muestran ángulos de contacto bajos, ver Figura 5.36 [98].

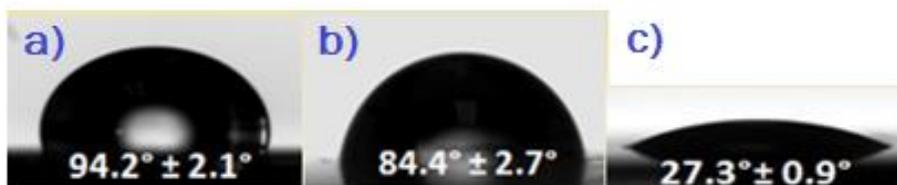


Figura 5.34 Fotografías de ángulo de contacto en superficies a) muy hidrofóbica, b) hidrofóbica y c) hidrofílica.

En el presente TFG se utiliza esta técnica para la comparación en el ángulo de contacto entre la superficie cubierta de fibras del polímero sin modificar, y el polímero modificado y entrecruzado por la luz UV.

Para realizar las mediciones del ángulo de contacto en el laboratorio se utiliza un goniómetro Dataphysics OCA 15 plus, Neurtek Instruments, que consta con una cámara de vídeo CCD adaptada, Figura 5.35.



Figura 5.35 Goniómetro Dataphysics OCA 15 plus

5.2.6.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La técnica utilizada para la validación de los resultados obtenidos en la microscopía óptica es la conocida como Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Está compuesta por tres detectores, que están instalados dentro de una cámara de vacío. La muestra se coloca en un porta de la cámara de vacío del microscopio, donde es escaneada por medio de un haz de electrones, convirtiendo las señales eléctricas en una imagen tridimensional que se observa en el monitor del ordenador.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento para obtener fotografías tridimensionales debido a que tiene una alta resolución y una gran profundidad de campo. En las fotografías se puede apreciar la estructura de muestras microscópicas detallando de manera extraordinaria, sus características morfológicas y topográficas [99].

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de una muestra se forman mediante el escaneo con un haz de electrones acelerados (0.5-30 kV). Los electrones interactúan con los átomos de la muestra, produciendo diversas señales que se pueden detectar y que contienen información sobre la topografía de la superficie de la muestra y la composición. El haz de electrones generalmente se escanea en un patrón de trama, y la posición del haz se combina con la señal detectada para producir una imagen [100].

Los electrones acelerados en un SEM llevan cantidades significativas de energía cinética que se disipa en forma de una variedad de señales producidas por las interacciones electrón-muestra cuando los electrones incidentes se frenan en la muestra sólida, ver **Tabla 5.5** [99, 101].

Señales Producidas	Función
Electrones secundarios	Producen imágenes del SEM (morfología y topografía)
Electrones retrodispersados	Producen imágenes del SEM (contrastes en composición de la muestra)
Electrones retrodispersados difractados	Determinar estructuras cristalinas y orientaciones de minerales
Fotones	Rayos X característicos para análisis elemental
Luz visible	Catodoluminiscencia (CL)
Calor	Disipación

Tabla 5.5 Resumen de las funciones realizadas por cada señal.

El análisis SEM se considera una técnica no destructiva, puesto que los rayos X generados por la interacción de electrones, no conducen a la pérdida de volumen de la muestra, por lo que es posible analizar los mismos materiales repetidamente [99, 102].

El SEM tiene como aplicaciones más destacadas la generación de imágenes de alta resolución de las formas de los objetos y mostrar las variaciones espaciales de las composiciones químicas. Con la técnica del SEM se consigue magnificaciones que va desde 20X hasta 30000X, con resoluciones espaciales de 50 a 100nm. Así, este enfoque es muy útil en la determinación cualitativa o semi-cuantitativa de composiciones químicas, estructura cristalina, orientaciones de cristal, etc [101, 102].

El microscopio electrónico de barrido utilizado para la evaluación de la morfología de las nanofibras en elaboración del presente TFG es el mostrado en la **Figura 5.36**, modelo 200FEG, de la casa comercial FEI Quanta SEM, perteneciente al Parque Científico de la Uva I+D.



Figura 5.36 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) de Quanta SEM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente apartado se exponen los resultados obtenidos en cada uno de los métodos seguidos para la elaboración del presente TFG, incluyendo la bioproducción del polímero, su modificación química, la caracterización, la síntesis de nanofibras por electrohilado y el entrecruzamiento de las mismas para obtener hidrogeles en forma de fibras.

6.1 BIOPRODUCCIÓN

Se lleva a cabo la producción del polímero VKV₄ mediante la fermentación en flasks descrita en el apartado 5.2.1 *Bioproducción*. Para ello se utilizan 12 erlenmeyers de plástico con deflectoras y un total de 0.6 L de medio de cultivo con el inóculo.

En primer lugar, tras la siembra de la placa Petri con las cepas de *Escherichia coli* y la incubación de las 8 mejores colonias se realiza un *screening* o cibrado de éstas, ver **Figura 6.1**, para determinar la de mayor producción del polímero VKV₄. Las colonias seleccionadas son la 2 y la 6 debido a que presentan una banda más gruesa en el PM del polímero, 60kDa.

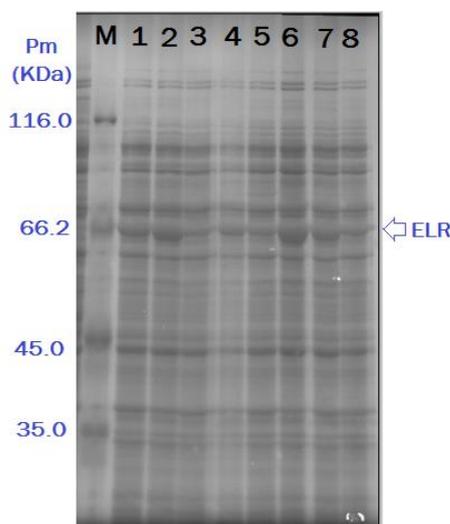


Figura 6.1 Screening de las 8 colonias seleccionables para inocular. Las calles corresponden al Marker (M) y a las 8 colonias (1-8).

Se realiza la producción inoculando la colonia más productiva y concluyendo una vez se agota el medio, lo cual es indicado mediante la medida de valores constantes en la absorbancia a lo largo del tiempo.

Esos valores de absorbancia medidos son de 9.3 en una primera muestra y 9.4 en la segunda, dándose por finalizado el período de producción, debido a la mínima variación.

Por último se purifica el biopolímero, mediante una serie de etapas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.2.1.7 *Extracción y Purificación*. Se comprueba que el polímero ha seguido la ruta esperada en la purificación y no se ha desviado en ninguno de los pasos mediante el análisis electroforético de la **Figura 6.2**.

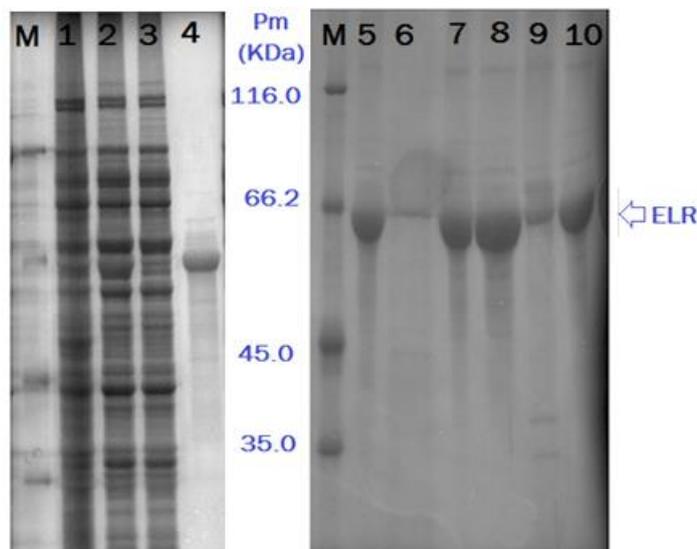


Figura 6.2 Electroforesis de las muestras en cada etapa de la purificación del VKV₄.

Calle M: Marker
Calle 1: Precipitado Ultrasonidos
Calle 2: Sobrenadante Ultrasonidos
Calle 3: Precipitado Ácido
Calle 4: Sobrenadante Ácido

Calle M: Marker
Calle 5: Precipitado Calentamiento 1
Calle 6: Sobrenad. Calentamiento 1
Calle 7: Precipitado Calentamiento 2
Calle 8: Sobrenad. Calentamiento 2
Calle 9: Precipitado Frío 2
Calle 10: Sobrenadante Frío 2

La cantidad total obtenida del polímero es de 693 mg. Debido a que la producción se llevó a cabo en 7.2 L de medio, el rendimiento total alcanzado es de **96.25 mg/L**.

El recombinámero VKV₄ obtenido es caracterizado mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía infrarroja (FTIR), espectrometría de masas (MALDI-ToF) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

El análisis electroforético SDS-PAGE realizado al polímero purificado, ver **Figura 6.3-a**, permite evaluar la pureza de la muestra. Se observa que el resto de fracciones han sido separadas en la purificación al presentar únicamente una banda a la altura del peso molecular del polímero VKV₄.

El peso molecular exacto del polímero sintetizado se determina mediante la técnica de espectroscopía de masas MALDI-ToF. A partir de la **Figura 6.3-b**,

se puede determinar el peso molecular de 60647 Da que coincide con el valor teórico de PM del polímero.

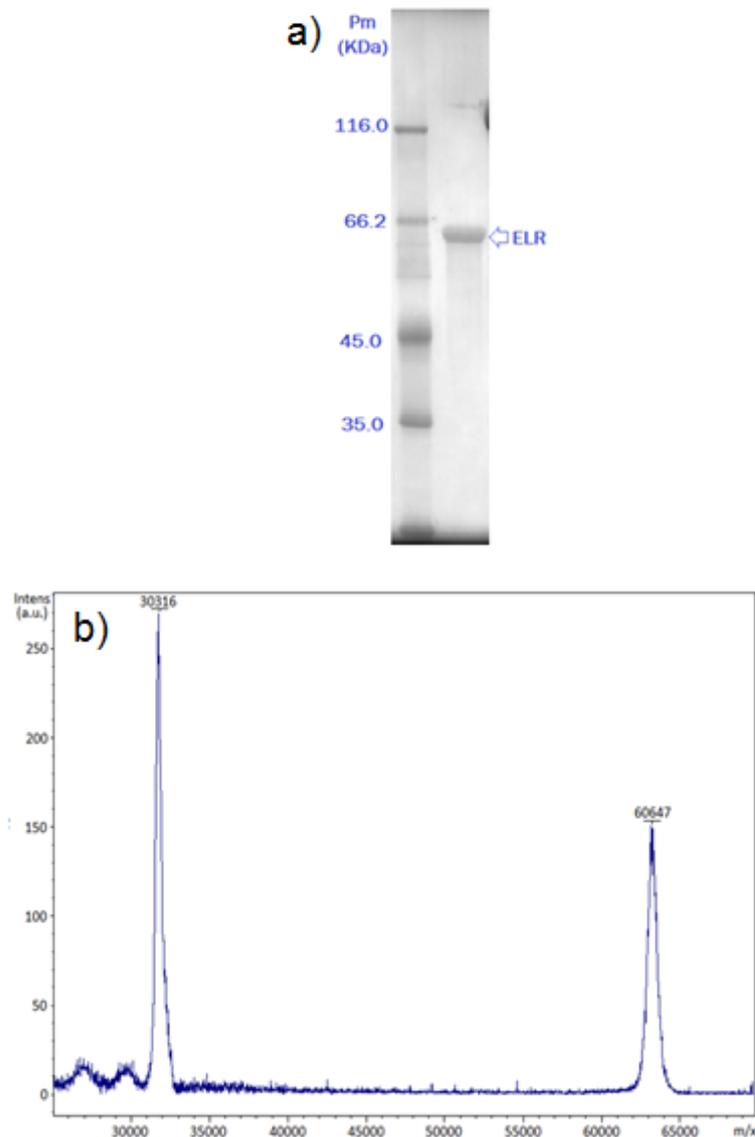


Figura 6.3 a) Análisis electroforético SDS-PAGE, b) Espectroscopía de masas (MALDI-ToF) del VKV₄.

Mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se analiza la estructura de las moléculas bioproducidas. El cálculo de las frecuencias a las que resuena cada protón de la biomolécula nos permite predecir el rango y la cantidad de señales de protones que tiene el polímero a lo largo de toda su secuencia.

El valor de las integrales de las señales obtenidas experimentalmente (**Figura 6.4**) son similares al número de protones presentes en el polímero, lo que corrobora la estructura del biopolímero.

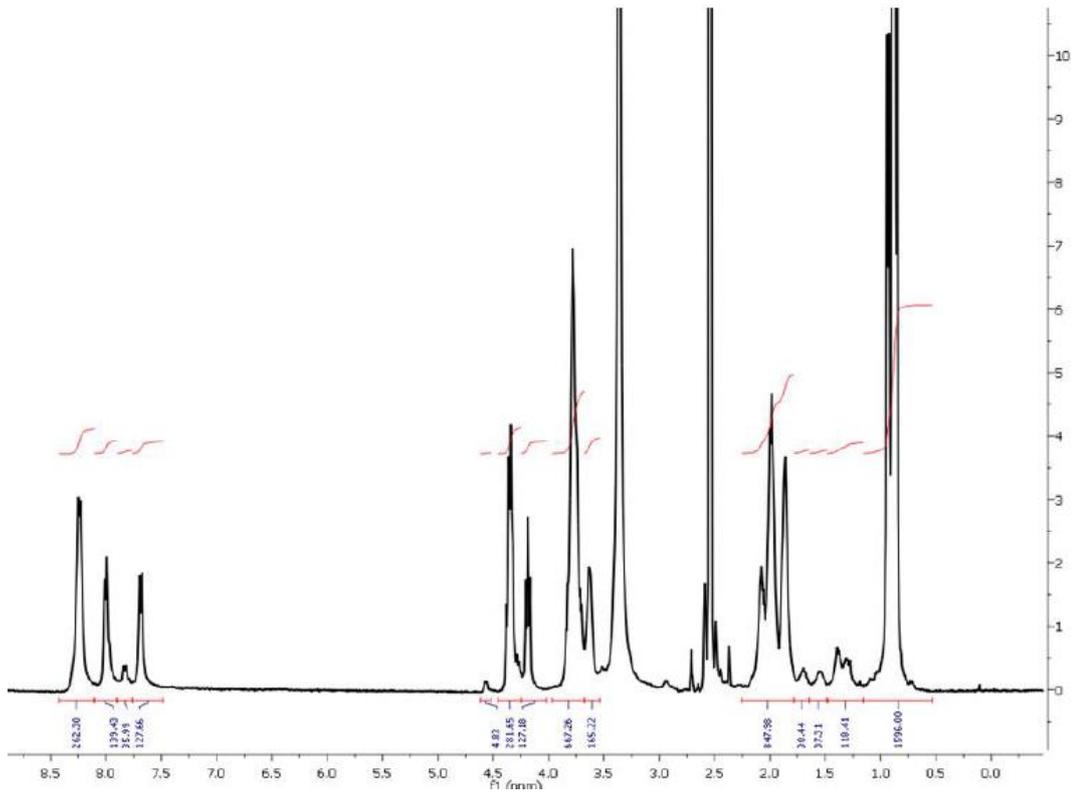


Figura 6.4 Espectro RMN polímero bioproducto VKV4.

El DSC es la técnica utilizada para determinar la temperatura de transición inversa de los polímeros en la que se basa el comportamiento inteligente y la entalpía asociada a dicho proceso. Los valores se recogen en la Figura 6.5, para diferentes valores del pH de la disolución.

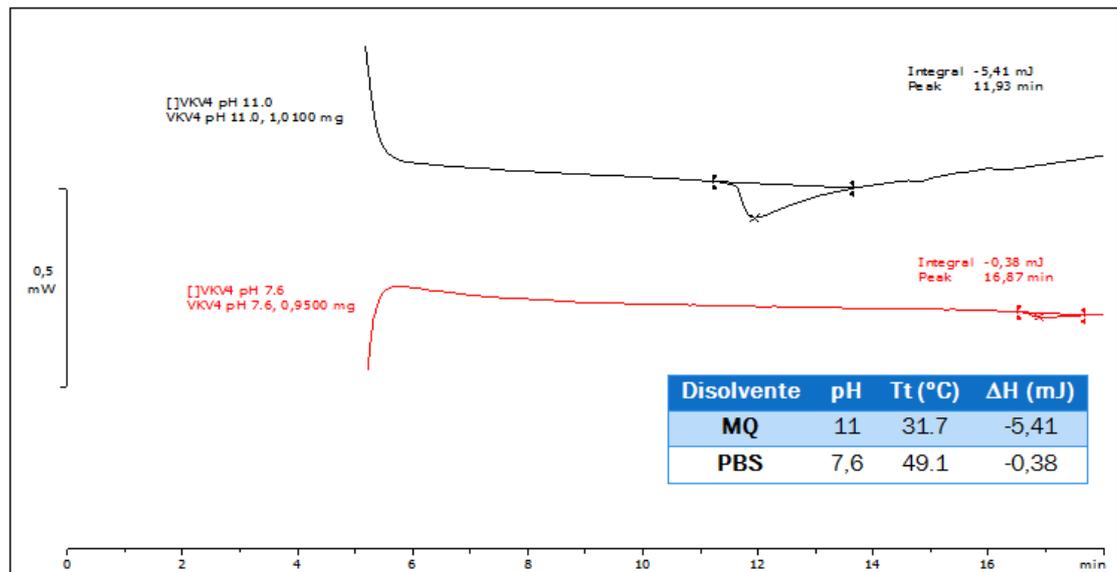


Figura 6.5 Termograma DSC de VKV4 en MQ a pH=11 y PBS a pH=7.6.

A partir del espectro infrarrojo FTIR, se pueden verificar los resultados obtenidos por RMN acerca de la estructura, debido a la absorción de luz infrarroja por parte de los diferentes grupos funcionales según la longitud de onda, ver **Figura 6.6**.

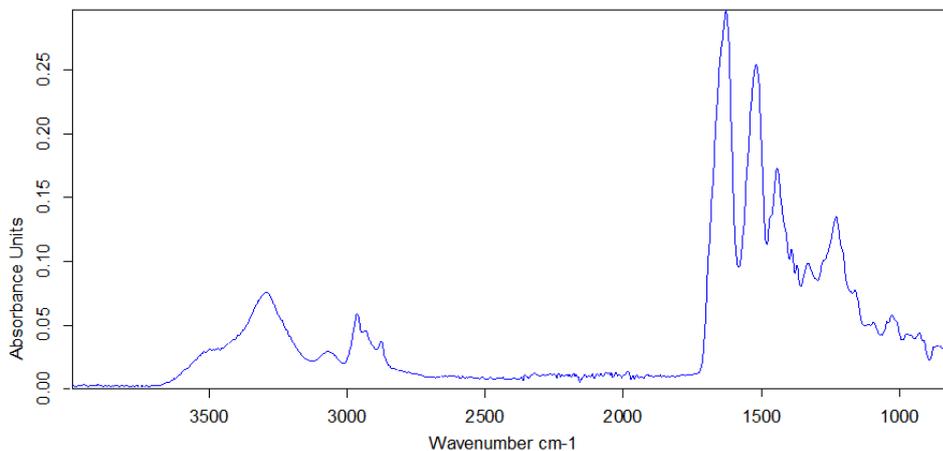


Figura 6.6 Espectro infrarrojo de VKV₄ bioproducido.

6.2 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE POLÍMEROS TIPO ELASTINA

La modificación del polímero para introducir en él un grupo fenil azido se realiza con objeto de proporcionarle carácter fotosensible. Así, cuando recibe luz UV se produce una reacción entre dichos grupos funcionales que provoca la unión covalente entre las cadenas a través de los grupos fenilazobenceno formados. Debido a la naturaleza de esos grupos fenilazobenceno, capaces de dar isomería cis-trans en función de la longitud de onda incidente, el hidrogel presenta fotosensibilidad como valor añadido.

Las reacciones llevadas a cabo a lo largo de este TFG se detallan en el apartado 5.2.2 *Modificación Química*.

De las 3 modificaciones llevadas a cabo, la reacción principal de este TFG es la de obtención del VKV₄-PH-N₃. Consiste en una reacción de amidación del grupo amino de las lisinas a partir del ácido *p*-azidobenzoico, buscando introducir en el polímero el grupo fenil azido, el cual es capaz de reaccionar con otros grupos fenil azido bajo la exposición de luz UV dando lugar a grupos fenilazobenceno, que podrían actuar como entrecruzantes en la formación de geles fotosensibles.

A partir del análisis de las experiencias llevadas a cabo anteriormente [103] se obtienen las siguientes conclusiones:

- La activación del carbono carboxílico del ácido azidobenzoico como anhídrido es una buena opción, debido a que las conversiones experimentales alcanzadas son elevadas (93%).

- La relación de 7,5 equivalentes de anhídrido utilizado por equivalente de lisina es la más óptima, en términos de que se favorecen conversiones mayores (93%) que con un número de equivalentes de orden inferior (1.5 eq 16%).

En la reacción de modificación entonces llevada a cabo en este TFG se activa el carboxilo mediante la síntesis del anhídrido azidobenzoico y se proporciona una relación de equivalentes anhídrido/lisina de 7,5.

6.3 CARACTERIZACIÓN ELR_s QUÍMICAMENTE MODIFICADOS

Los productos finales modificados son caracterizados, siguiendo el apartado 5.2.3, de forma que se puedan utilizar en posteriores experiencias asegurando unas características concretas.

A continuación se muestra la caracterización mediante FTIR, H-RMN y MALDI-ToF del VKV₄-PH-N₃. Las caracterizaciones de los otros polímeros modificados: VKV₄-N₃ y VKV₄-ciclooctino se encuentran en el [Anexo I](#).

Rendimiento de la reacción

Se determina el rendimiento de la reacción y purificación del polímero modificado a partir de la relación entre el número de moles de polímero obtenidos y empleados en la reacción.

Reacción	Masa Inicial (mg)	Moles Inicial	Masa Final (mg)	Moles Final	Rendimiento
VKV ₄ -PH-N ₃	300	0.0050	150	0.0024	48%
VKV ₄ -PH-N ₃	500	0.0083	375	0.0059	72%
VKV ₄ -N ₃	1500	0.0248	985	0.0059	65%
VKV ₄ -ciclo	3000	0.0496	2240	0.0364	73%

Tabla 6.1 Rendimientos en las modificaciones químicas realizadas.

- **Espectroscopía de infrarrojo FTIR-ATR.**

En un estudio comparativo de los espectros infrarrojos de los polímero sin modificar, VKV, y modificados, VKV₄-PH-N₃, se comprueba la presencia de grupos azido en el polímero modificado debido a la aparición de una nueva señal a 2100 cm⁻¹, (ver **Figura 6.6** y **Figura 6.7**), característica de la absorbancia de dicho grupo.

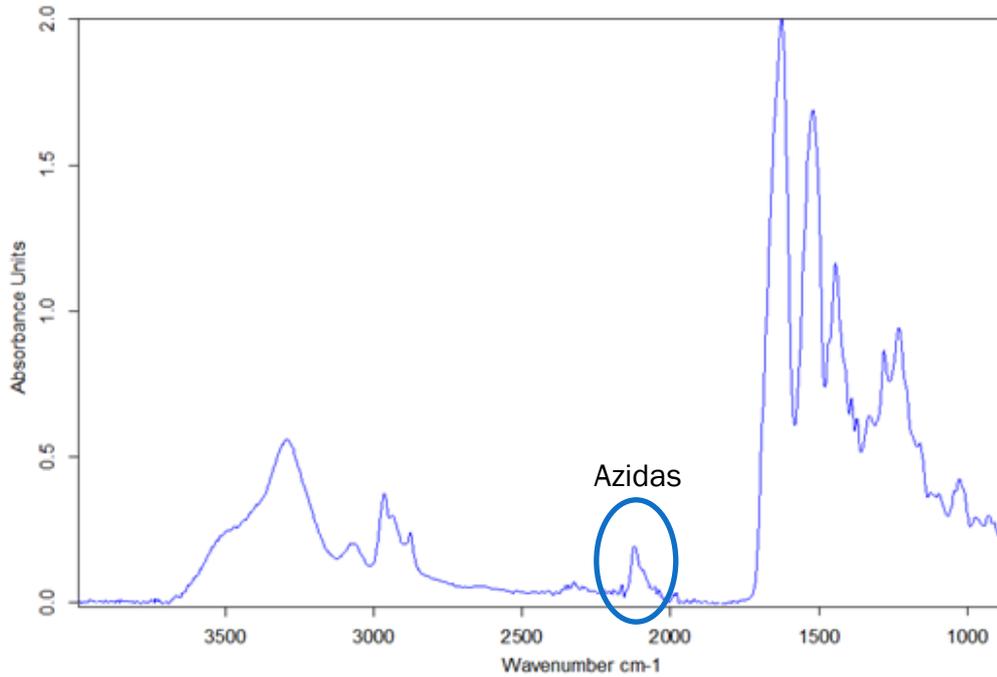


Figura 6.7 Espectro infrarrojo del polímero modificado VKV₄-PH-N₃.

- Resonancia Magnética Nuclear de protón (H-RMN).

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) del polímero modificado muestra la aparición de dos nuevos picos entre 7 y 8 ppm, Figura 6.8, no presentes en el espectro del polímero sin modificar, Figura 6.4.

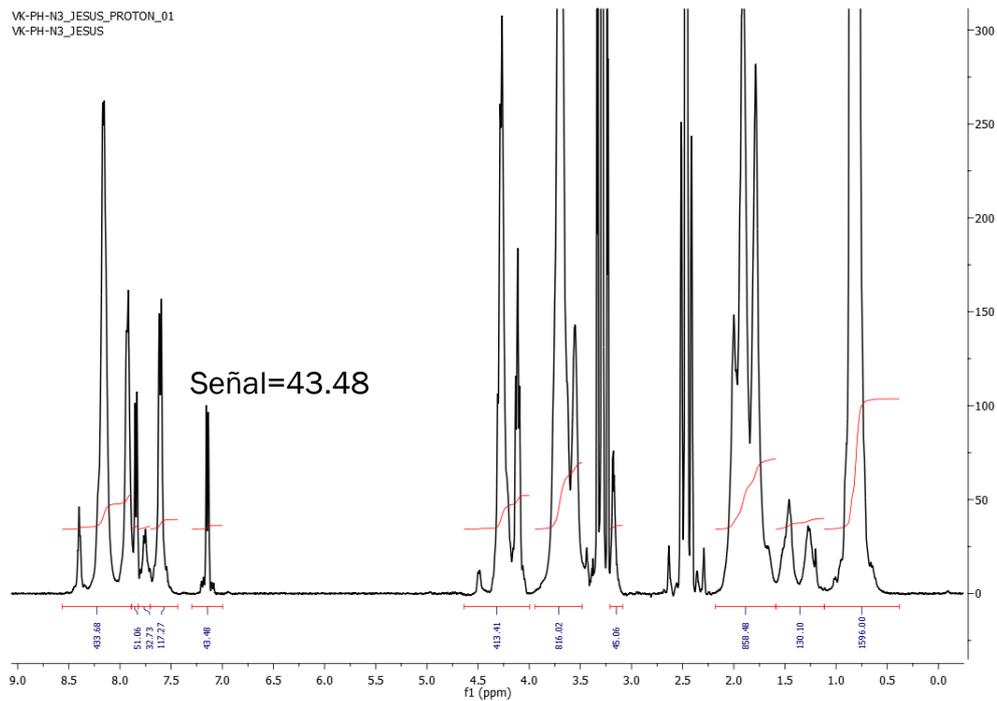


Figura 6.8 Espectro H-RMN del VKV₄-PN-N₃

El tanto por ciento de conversión de las lisinas se determina a partir del valor de las integrales de estas señales. El anillo bencénico introducido consta de 4 protones, de los cuales resuenan 2 a 7,2 ppm y otros 2 a 7,9 ppm, debido a los diferentes grupos funcionales que tiene unidos, ver **Figura 6.9**. De entre ellas se toma como referencia la correspondiente a 7,2 ppm ya que se muestra aislada en la zona del espectro donde resuena.

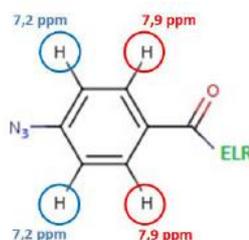


Figura 6.9 Estructura del grupo fenilazido y dónde resuena cada protón.

Una vez normalizada la integral de la señal de CH₃ a 1 ppm con 1596 protones, se obtiene el valor de la integral a 7,2. De esta forma, se obtiene que el número de lisinas modificadas corresponde a la mitad del valor de esa integral.

La conversión alcanzada en la modificación con fenilazidas es del 91%, con un total de 21 lisinas modificadas sobre el máximo de 24 posibles.

- **Espectrometría de masas (MALDI-ToF)**

La espectrometría de masas permite observar la variación en el peso molecular del recombinámero modificado, **Figura 6.10**, respecto del inicial, **Figura 6.3**. En el caso del VKV₄ modificado con grupos fenil azido, cada grupo amino modificado conlleva un incremento del peso molecular del polímero de 145 Da, debido a la sustitución del grupo -NH₂ por -PH-N₃.

Entonces se puede contrastar la conversión calculada mediante RMN determinando el número de lisinas modificadas:

$$lys = \frac{\Delta PM}{145} \quad Conv = \frac{lys}{24} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde, lys: es el número de lisinas modificadas, ΔPM : es la diferencia entre el peso molecular del polímero modificado y sin modificar, Conv: conversión calculada a partir de los pesos moleculares.

A partir de la *Ecuación (1)* se obtiene la cantidad de lisinas modificadas, 20, y por tanto una conversión alcanzada de 85%, del orden de la obtenida por NMR.

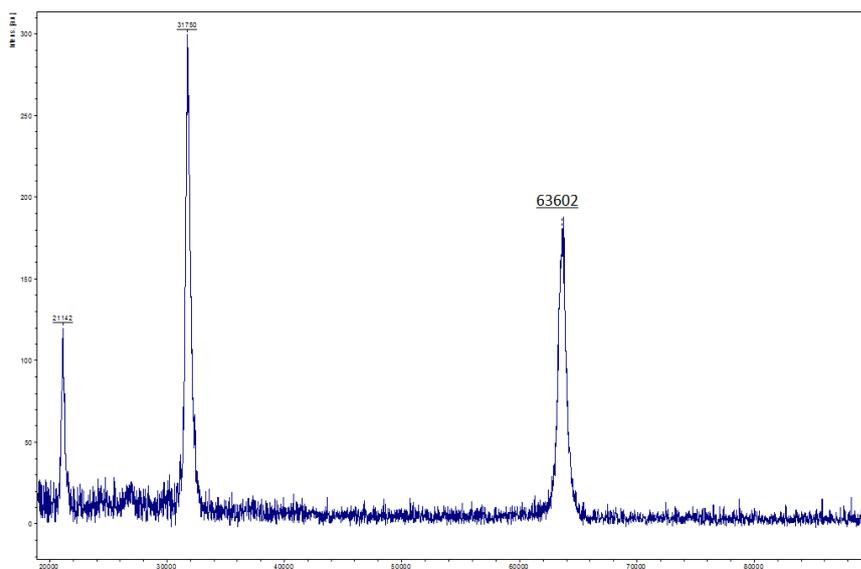


Figura 6.10 Espectrometría de masas (MALDI-ToF) del VKV4-PH-N3.

6.4 SÍNTESIS DE HIDROGELES

En el presente trabajo se ha producido un hidrogel en forma de pastilla mediante un molde de Teflón taponado con una muestra de PDMS, utilizando un volumen de 600 μ L de una disolución de concentración 100 mg/ml del recombinámero fotosensible, VKV₄ modificado con fenilazidas. Se preparó siguiendo el procedimiento de irradiación con luz UV descrito en el apartado 5.2.5.

Se trabajó partiendo de la base de las experiencias realizadas previamente en el grupo. Inicialmente, se realizó una espectroscopía UV-Vis, ver **Figura 6.11**, para la determinación de la longitud de onda a la que se produce la máxima absorción de luz por parte del polímero.

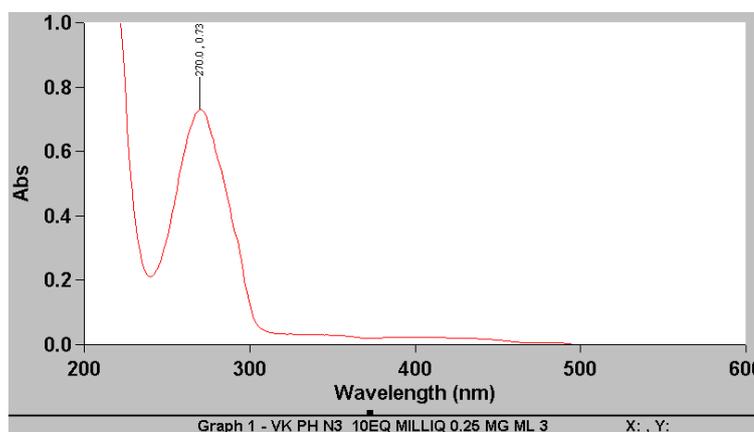


Figura 6.11 Gráfico de absorbanza de luz según la longitud de onda por parte del polímero VKV₄-PH-N₃.

A la vista de la gráfica, el polímero utilizado presenta el pico de absorbancia de luz a 270 nm, por lo que se utiliza la lámpara con un filtro de irradiación en el rango de 200-400 nm.

El ensayo realizado consistió en la irradiación de la disolución contenida en un molde mediante un haz UV, durante un tiempo de 2 horas. Este tiempo se estimó como suficiente para la formación del gel ya que en experiencias anteriores se utilizaron tiempos mayores, de hasta 8 horas, debido a que la longitud de onda de irradiación no coincidía con la de máxima absorción del polímero.

Durante el proceso de irradiación es importante mantener la muestra en frío mediante una cama de hielo, para evitar la transición del polímero con la temperatura.

El resultado obtenido, **Figura 6.19**, fue la preparación de un hidrogel en forma de pastilla, de tono anaranjado, aspecto frágil y textura pegajosa.



Figura 6.12 Hidrogel sin molde tras 2 horas de irradiación.

Recordamos que el grupo azobenceno, formado al entrecruzarse las cadenas de los recombinámeros a través de sus grupos fenil azido en presencia de luz UV, presenta isomería cis-trans en función de la luz. Así, en oscuridad adopta una disposición trans, mientras que bajo iluminación revierte a una configuración cis.

Estudios anteriores llevados a cabo en el grupo de investigación muestran que el carácter termo y fotosensible de los recombinámeros se mantiene en la estructura entrecruzada. Por este motivo, el gel producido se intentó someter a pruebas de reología para evaluar su comportamiento con condiciones de oscuridad y de luz y detectar el posible cambio de propiedades reológicas en función de dichas condiciones de iluminación. Sin embargo, los ensayos de reología realizados no fueron concluyentes debido a que al someterle a la presión del pistón, el gel sobresalía de la geometría, se deformaba e incluso se resquebraja.

El escaso entrecruzamiento observado en el hidrogel parece ser debido a que al irradiar la capa superior las moléculas de recombinámeros se entrecruzan, dificultando el paso de luz a las capas inferiores. Se produce, por tanto, una irradiación irregular en toda la disolución que provoca no sólo un escaso entrecruzamiento sino que, además, éste no sea uniforme, sino gradual con la profundidad.

Finalmente, se llevan a cabo los ensayos para determinar si el carácter termosensible del recombinámero se mantiene en el hidrogel. Para ello se analiza el cambio del tamaño del hidrogel con la temperatura. A bajas temperaturas el gel presentará las cadenas del polímero más estiradas, de forma que puede hincharse con el agua en mayor proporción que cuando se calienta por encima de su temperatura de transición. Así, a 37°C el hidrogel presentará sus cadenas poliméricas replegadas, disminuyendo el grado de hinchamiento del gel y, por tanto, disminuyendo el tamaño del mismo. En el gel producido el cambio se observa ligeramente, pero no es muy notable debido a que está desgastado, deformado y quebrado tras los intentos reológicos, **Figura 6.13**.



Figura 6.13 Hidrogel deformado tras reología a) 4°C b) 37°C

6.5 OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS Y CARACTERIZACIÓN

En este apartado se detallan los resultados obtenidos con la técnica descrita en el apartado 5.2.4 y 5.2.5, y su caracterización mediante microscopía óptica, electrónica, ángulo de contacto y cultivo celular, descritos en el apartado 5.2.6.

6.5.1 Electrohilado: Optimización de la técnica

6.5.1.1 Optimización de las variables en “vertical”

Las primeras experiencias llevadas a cabo para la obtención de superficies recubiertas con fibras se realizaron por electrohilado “en posición vertical” de una disolución del polímero HRGD6 en trifluoroetanol. El montaje en orientación vertical del equipo favorece la salida de la disolución de la

aguja por efecto de la gravedad. El colector empleado para recoger las fibras son superficies de óxido de titanio e indio, ITO.

La experiencia en el grupo de investigación sobre esta técnica indica el uso de disoluciones al 10% en peso (100 mg/ml) como las más adecuadas para la obtención de fibras.

Los parámetros utilizados para determinar las condiciones óptimas de trabajo, que conduzcan a fibras regulares, se muestran en la **Tabla 6.2**. Asimismo se especifican los intervalos de variación de los mismos, a fin de encontrar relaciones lógicas entre ellos y los resultados obtenidos.

Concentración (mg/ml)	Caudal (ml/min)	Potencial (kV)	Distancia cm	Tiempo (s)	Posición
100	0.002-0.01	12.5-30	9-19	15-240	Vertic.

Tabla 6.2 Rango experimental utilizado de los parámetros para HRGD6 en vertical.

En las primeras experiencias el exceso de adhesivo entre el ITO y el tornillo electrodo reducía el contacto entre ambos y hacía de aislante por lo que perjudicaba la recogida de las fibras formadas y solo se observaba la formación de spray, ver **Figura 6.14**. Este spray consiste en los minúsculos puntitos de la imagen que en realidad se corresponden con fibras pequeñísimas de muy corta longitud, que son únicamente observables al máximo aumento del microscopio y lógicamente no son el objetivo de la producción. Mientras, las fibras más grandes se dispersaban por la caja de metacrilato sin caer en el colector, por ello se optó por reducir el adhesivo al máximo posible de forma que no fuese un obstáculo ni hiciera de aislante.

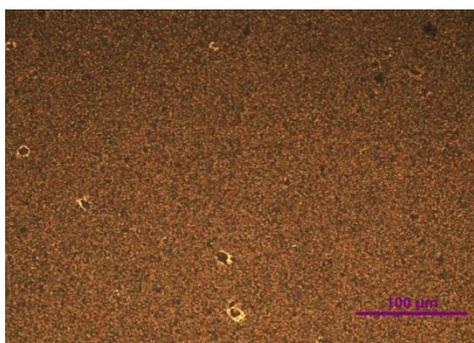


Figura 6.14 (10% 0.002ml/min 16 kV)

Las primeras experiencias utilizan ese rango de caudales, tomando como punto de partida experiencias anteriores. Así, se utilizaron flujos de 0.002, 0.005 y 0.01 ml/min, al mismo tiempo que se iba variando la diferencia de potencial entre 15 kV y 30 kV con el fin de observar el mejor cono de Taylor y el desprendimiento de pequeños hilos a simple vista.

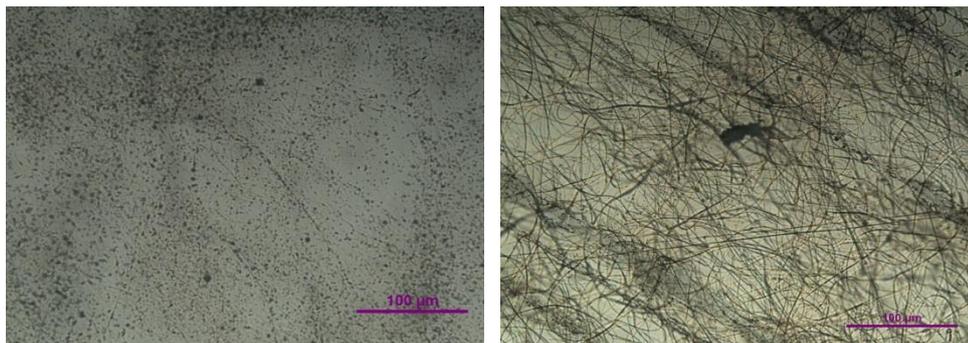


Figura 6.15 (10% 0.005ml/min 30 kV) **Figura 6.16** (10% 0.01ml/min 30 kV)

A la vista de los resultados obtenidos, como se muestra en las **Figuras 6.15 y 6.16**, se seleccionaron condiciones de flujo 0.01 ml/min y 30 kV de potencial, ver **Figura 6.16**, puesto que para esas variables en los rangos especificados se obtenían fibras mejores en diámetro y longitud y menor cantidad de perlas.

Para determinar el tiempo de producción de fibras óptimo para recubrir las superficies, se hicieron varias pruebas de recubrimiento de superficies de ITO en las mismas condiciones de caudal de flujo, potencia, concentración de la disolución y distancia entre electrodos y utilizando distintos periodos de tiempo. Se comprueba inicialmente que los parámetros utilizados producen la formación de fibras. Se prepararon varias muestras utilizando desde 10-15 segundos hasta 4 minutos.

A partir de 1 minuto, el recubrimiento era tal que tomaba aspecto de manta formada por muchísimas fibras y perlas, lo que hacía imposible distinguirlas al microscopio, ver **Figura 6.18**. Dicha manta se puede observar en la **Figura 6.19**, en la cual ha sido levantada ligeramente mediante una pinza para comprobar que el recubrimiento se trata de una única película. Por tanto, los tiempos empleados serán entre 10 y 30 segundos para poder analizar las fibras obtenidas como en la **Figura 6.17**.

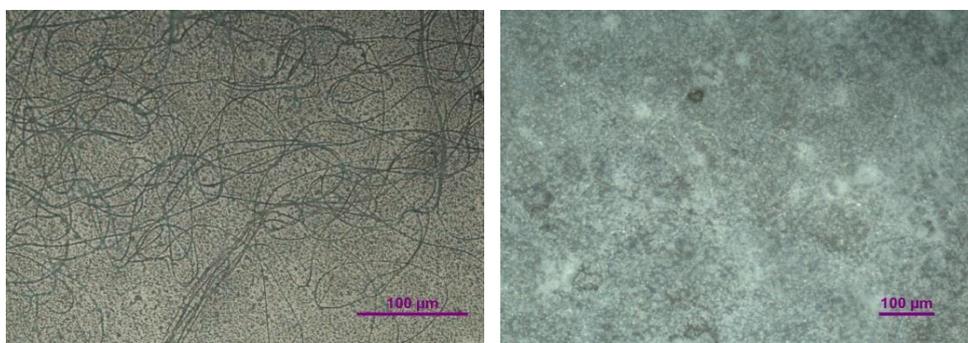


Figura 6.17 (10% 17 kV, 10seg)

Figura 6.18 (10% 17 kV, 3min)



Figura 6.19 (10% 17 kV, 10seg)

Se realizó un barrido de distancias entre la aguja y el colector, con el resto de parámetros fijados en los valores en que se había detectado la formación de fibras, para determinar su influencia en el resultado final.

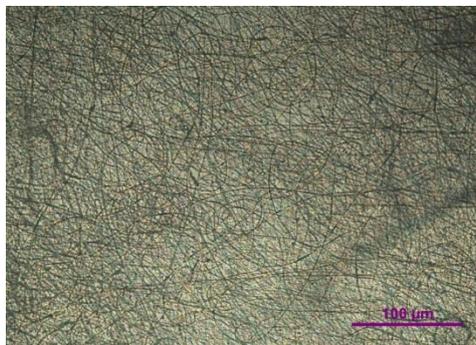


Figura 6.20 (10% 30kV, 19cm)



Figura 6.21 (10% 30kV, 9cm)



Figura 6.22 (10% 30kV, 12cm)

En vista de los resultados obtenidos la distancia que se considera más óptima es la intermedia de 12 cm, **Figura 6.22**, debido a que las fibras tienen un diámetro mayor que en la **Figura 6.21**, donde son muy finas y presentan muchos defectos debido a que el colector está muy próximo y no hay tiempo suficiente para permitir evaporar el disolvente. En la **Figura 6.20**, de mayor distancia, las fibras presentan también imperfecciones en forma de pequeñas perlas y spray debido a que el colector está demasiado lejos, reduciendo también el diámetro de fibra obtenido.

Entonces las condiciones óptimas utilizadas en vertical para la obtención de las fibras de la **Figura 6.22** son las siguientes:

Concentración (mg/ml)	Caudal (ml/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Posición	Temperatura (°C)	Humedad (%)
100	0.01	29.7	14	15	Vertic.	22.5	43

Tabla 6.3 Parámetros experimentales optimizados para electrohilado en posición vertical.

Se llevó a cabo un experimento variando la humedad con las mismas condiciones en que se obtienen fibras. Para ello se introdujo dentro de la caja de metacrilato un recristalizador con agua hirviendo, de forma que tras varios minutos, la humedad aumentó desde un 36 % inicial hasta el 70 %. El resultado fue que se siguen obteniendo fibras en ambas condiciones, pero un aumento de humedad implica muchos más defectos en forma de grumos.

6.5.1.2 Optimización de las variables en “horizontal”

Tras la obtención de fibras en orientación vertical, se cambió el montaje de electrohilado a posición horizontal con el mismo biopolímero, buscando eliminar el problema de la caída de gotas de disolvente en el colector, ver *apartado 6.5.1.1*.

Para la obtención de fibras en orientación horizontal se parte de los parámetros fijados en posición vertical y se optimizan. En estas nuevas condiciones con el potencial de 30 kV se obtuvieron fibras finas y pequeñas además de muchas perlas formando spray. Por tanto, se modificó la diferencia de potencial aplicada utilizando los siguientes valores: 30 kV, 27 kV, 24 kV, 20 kV y 18.2 kV. Este último potencial, 18.2 kV, permitió obtener una gran cantidad de fibras del aspecto deseado. De esta manera se fijan las condiciones reflejadas en la **Tabla 6.4** como las adecuadas para la obtención de fibras del recombinaómero HRGD6.

Concentración (mg/ml)	Caudal (ml/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Posición	Temperatura (°C)	Humedad (%)
100	0.01	18.2	12	15	Horiz.	23.3	36

Tabla 6.4 Parámetros experimentales óptimos en la obtención de fibras de HRGD6.

A continuación se presentan las muestras de estas experiencias:

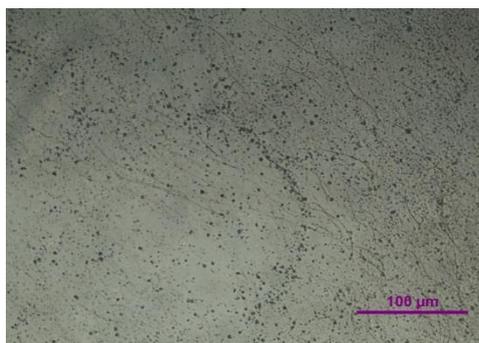


Figura 6.23 (10% 30 kV, 12cm)

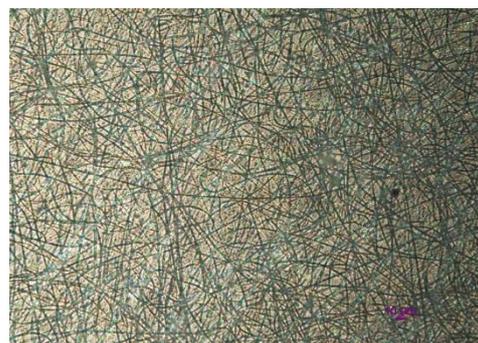


Figura 6.24 (10% 18.2 kV, 12cm)

Se puede observar cómo en la **Figura 6.23** existen fibras, pero son muy finas y pequeñas, y además se forman perlas por toda la superficie del colector, ITO, debido a que la diferencia de potencial es demasiado alta y las fibras se rompen. En la **Figura 6.24**, reduciendo considerablemente el potencial, se obtiene una gran densidad de fibras de mayor diámetro y longitud que recubren totalmente la superficie de ITO.

6.5.2 Electrohilado de fibras fotosensibles.

6.5.2.1 Ensayos Iniciales: Optimización de variables

Antes de llevar a cabo el electrohilado con el polímero modificado VKV₄-PH-N₃., realizamos la optimización de las variables del proceso con el mismo biopolímero sin modificar, VKV₄, considerando que van a tener un comportamiento similar frente a la técnica.

Para la obtención de fibras del recombinámero VKV₄ se parte de inicio de los mismos parámetros de operación ya optimizados en el apartado anterior para un recombinámero semejante como HRGD6, ver **Figura 6.25-6.26**. Se trabaja directamente con el montaje en horizontal, ya que se había observado que las fibras obtenidas eran de mejor calidad; y las condiciones de temperatura y humedad se mantienen muy similares.



Figura 6.25 (10% 0.01ml/min 19 kV)



Figura 6.26 (10% 0.01ml/min 18.2 kV)

Como se muestra en las **Figuras 6.25-6.26**, para las condiciones optimizadas, y variando ligeramente el potencial suministrado, las fibras obtenidas con potenciales de 19-18 kV son un poco finas. En siguientes ensayos se opta por reducir ligeramente el potencial aplicado hasta 17 kV, **Figura 6.27**. En estas condiciones se obtiene bastante densidad de fibras más gruesas y largas sin nada de spray, como se puede observar en las siguientes imágenes a diferentes aumentos del microscopio.

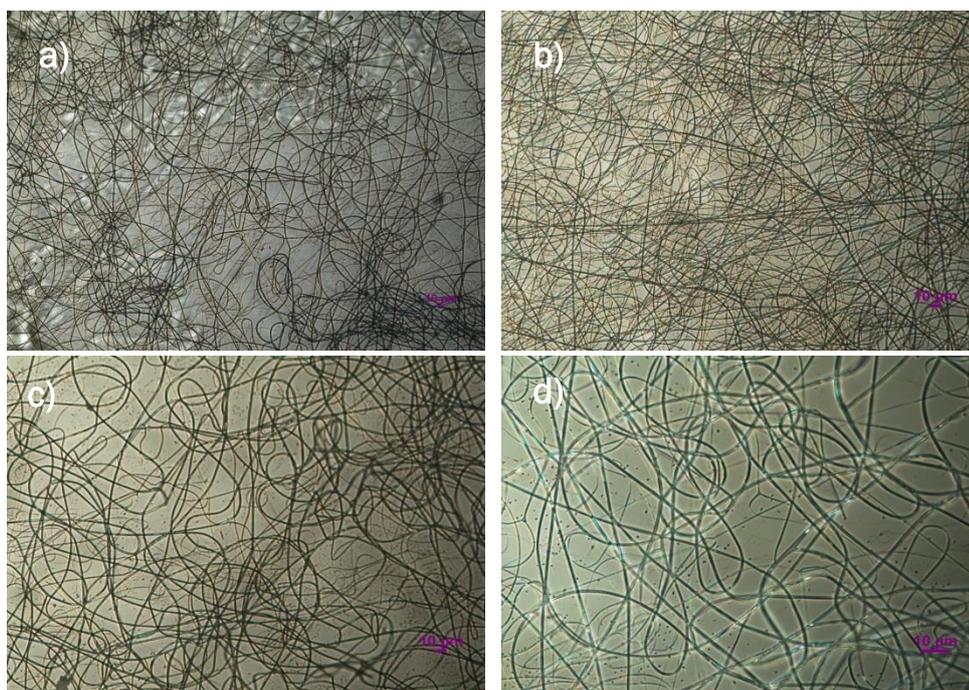


Figura 6.27 (10% 0.01ml/min 17 kV, 12cm) a) x10 b-c) x20 d) x50.

A la vista de los resultados, las condiciones óptimas en la obtención de fibras a partir de la disolución de VKV₄ en TFE son las recogidas en la **Tabla 6.5**:

Concentración (mg/ml)	Caudal (ml/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Posición	Temperatura (°C)	Humedad (%)
100	0.01	17	10	15	Horiz.	26.1	34

Tabla 6.5 Parámetros experimentales óptimos en la obtención de fibras de VKV₄.

Por lo general, en la producción de nanofibras, se puede observar a simple vista como se recubre la superficie adquiriendo un aspecto blanquecino e igualmente se pueden ver fibritas que se desprenden de la aguja y se mueven por efecto del potencial hasta adherirse a la caja de metacrilato. En la imagen de la **Figura 6.28**, se puede observar una fibra recogida con una pinza formada por muchísimas fibras que se han adherido tras varios minutos de producción.

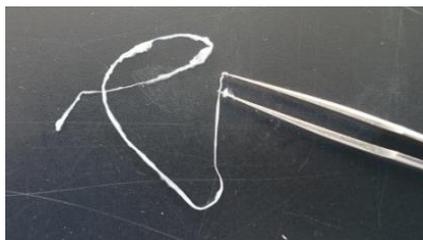


Figura 6.28 Fibras grandes desprendidas por la aguja y visibles al ojo humano.

6.5.2.2 Producción de fibras fotosensibles a partir del recombinaómero modificado VKV₄-PH-N₃

Una vez aprendida y controlada la técnica de electrohilado, se lleva a cabo la producción de fibras fotosensibles a partir de una disolución del polímero modificado con fenilazidas, VKV-PH-N₃, en trifluoroetanol (TFE). Inicialmente se recubrirán superficies de ITO y, finalmente, se recubrirán las superficies de vidrio necesarias para llevar a cabo los ensayos celulares de citotoxicidad y viabilidad.

a) *Electrohilado en posición vertical:*

En los primeros ensayos se buscó optimizar la producción de fibras fotosensibles con el montaje en orientación vertical.

Se realiza una comparación entre resultados obtenidos variando cada uno de los parámetros importantes en la técnica de electrohilado. Los rangos utilizados se recogen en la **Tabla 6.6**:

Concentración (mg/ml)	Caudal (ml/min)	Potencial (kV)	Distancia cm	Tiempo (s)	Posición
50-100	0.002-0.01	20-30	10-14	10-45	Vertic.

Tabla 6.6 Rango experimental utilizado para los parámetros para VKV₄-PH-N₃ en vertical.

Influencia de la concentración.

En primer lugar se analizó la influencia de la concentración en el proceso de electrohilado. Para ello se prepararon disoluciones de 50 y 100 mg/ml, manteniendo, manteniendo las condiciones óptimas de trabajo previamente estudiadas, es decir, flujo 0.01 ml/min, potencial 30 kV, distancia 12 cm y condiciones ambientales similares. La **Figura 6.29** muestra el recubrimiento de una superficie obtenido a partir de una disolución al 5 % en peso (50 mg/ml). Observamos la presencia de perlas y grumos por toda la superficie del ITO debido, probablemente, a que la concentración de polímero no es suficiente para formar las fibras y únicamente pueden formar perlas.

No obstante, en una segunda experiencia se disminuye el potencial hasta 20 kV con el objeto de comprobar si un menor potencial permitiera formar fibras con esta concentración. Desafortunadamente se sigue obteniendo superficies recubiertas de spray y perlas; además se pueden llegar a apreciar gotas de disolvente debido a que el cono de Taylor empieza a gotear porque el potencial aplicado no es suficiente.

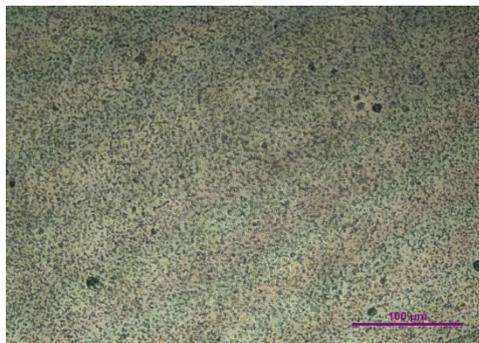


Figura 6.29 (5% 30 kV)

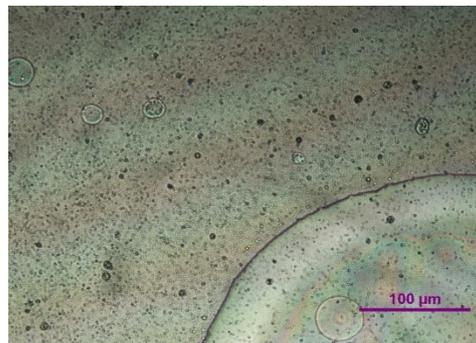


Figura 6.30 (5% 20 kV)

En los ensayos posteriores trabajamos con concentración al 10%, comprobándose, como se explica a continuación, que sí es suficiente para la producción de fibras.

Influencia del flujo de caudal.

En cuanto al rango de caudales, proporcionados por la impulsión de la bomba, se realizó un barrido con 0.002 ml/min, 0.005 ml/min y 0.01 ml/min. La utilización de un flujo superior se descartó debido a que en las experiencias anteriormente realizadas con un flujo mayor, 0.02 ml/min, no sólo no se obtenían fibras sino que se recogían muchas gotas de disolvente y spray.

Se efectuaron entonces las experiencias para determinar las condiciones óptimas respecto al flujo a utilizar, utilizando un potencial estándar de 22 kV, y manteniendo las condiciones de distancia, concentración y tiempo. Se observa en las Figuras 6.31 y 6.32 cómo las fibras son de mayor diámetro con el flujo mayor, 0.01 ml/min, mientras que con flujos pequeños, 0.002 ml/min, se observan apenas hilitos muy finos. Las muestras obtenidas presentan muchos defectos y spray debido a que, como se explica a continuación, el potencial aplicado en esta experiencia no es el más óptimo, pero sí fue útil para ver las diferencias del tamaño de las fibras en función del flujo de la disolución.

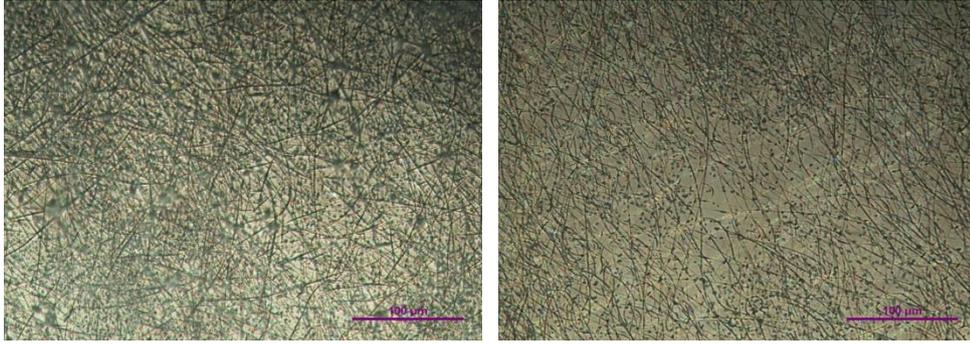


Figura 6.31 (10% 0.01 ml/min 22 kV) **Figura 6.32** (10% 0.002 ml/min 22 kV)

Influencia del potencial.

Una vez se ha comprobado que el valor óptimo para el flujo debe ser 0.01 ml/min y que con 50 mg/ml no obtenemos fibras, se lleva a cabo un análisis del potencial aplicado necesario. Los ensayos se plantean partiendo de inicio de un potencial elevado como es 30 kV y, posteriormente, disminuyendo dicho potencial, **Figura 6.33**. En un primer ensayo a 30 kV se obtienen perlas similares a las obtenidas cuando se utilizaba la concentración al 5%, con la diferencia de que también hay pequeñas fibras rotas, lo que implica que la diferencia de potencial aplicada es demasiado alta. Se reduce primero hasta 25.5 kV, **Figura 6.34**, donde ya se observan muchas fibras aunque todavía finas y con defectos, y después hasta 24 kV y 22 kV, **Figuras 6.35-6.36**.

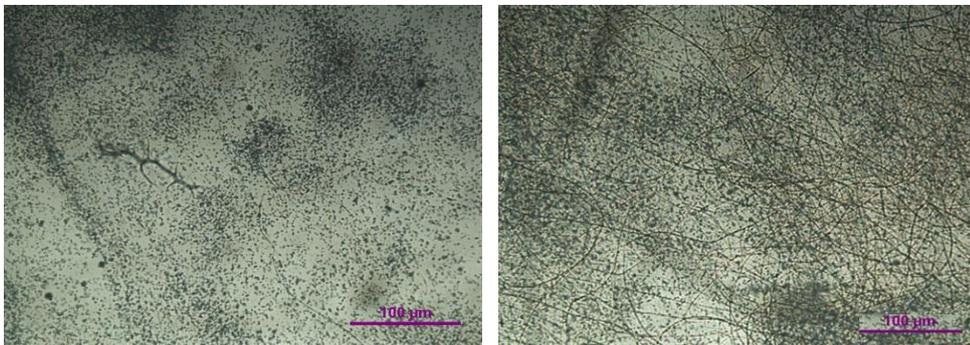


Figura 6.33 (10% 0.01 ml/min 30 kV) **Figura 6.34** (10% 0.01 ml/min 25.5 kV)

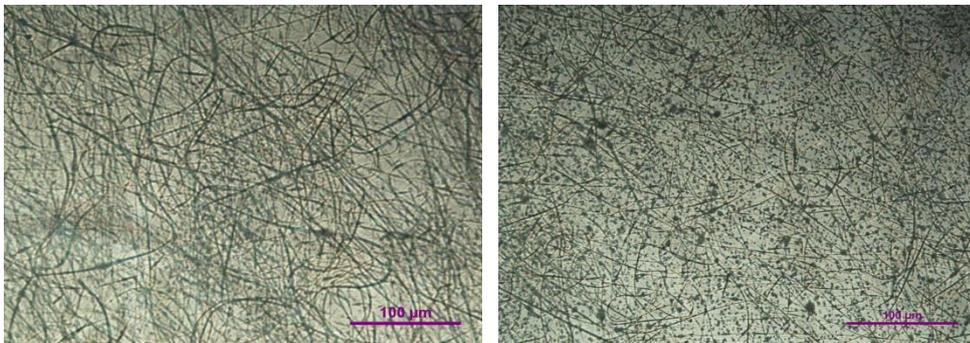


Figura 6.35 (10% 0.01 ml/min 24 kV) **Figura 6.36** (10% 0.01 ml/min 22 kV)

Tras el barrido de potencial realizado se detecta que con 24 kV se obtienen las mejores fibras, en cuanto a longitud, diámetro y ausencia de defectos. Potenciales superiores implican fibras quebradas y fragmentos rotos mientras que potenciales algo inferiores generan defectos al no llegar al potencial umbral necesario para la formación de fibras.

Las condiciones en las que se han obtenido mayor densidad y mejores fibras son con las condiciones de la **Tabla 6.7**. Y las fibras obtenidas se muestran en la **Figura 6.35**.

Concentración (mg/ml)	Caudal (ml/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Posición	Temperatura (°C)	Humedad (%)
100	0.01	24	12-14	15	Vertical	22-25	30-36

Tabla 6.7 Mejores condiciones para la obtención de fibras de VKV4-PH-N3 con montaje vertical.

b) Electrohilado en posición horizontal:

Las mejores condiciones en las que se obtienen fibras fotosensibles en posición vertical, mostradas en la **Figura 6.35**, muestran la presencia de alguna perla y gotitas procedentes del disolvente. Con objeto de evitar estos inconvenientes, llevamos a cabo la producción de fibras fotosensibles en posición horizontal. Para ello utilizamos las condiciones óptimas obtenidas en el apartado de 6.5.1.2 *Optimización de variables en horizontal*, es decir, concentración al 10%, flujo de 0.01 ml/min, potencial 18 kV, distancia de 12 cm.

Con estas condiciones optimizadas comprobamos que efectivamente se obtienen fibras fotosensibles, **ver Figura 6.38**. Sin embargo, se analiza la influencia de la humedad, manteniendo esas mismas condiciones en un día de lluvia, con humedades en torno al 50%, **ver Figura 6.37**. En este caso, se obtienen las fibras fotosensibles con bastantes defectos en forma de cuentas grandes debido a que se perjudica la evaporación del disolvente.

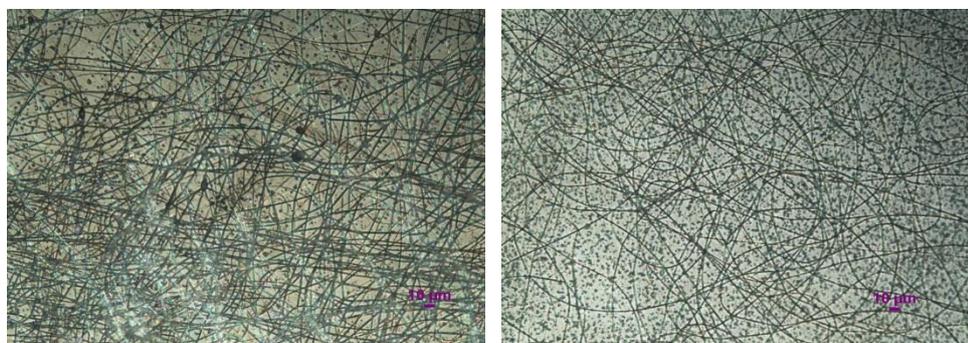


Figura 6.37 (10% 19 kV 49%hum) **Figura 6.38** (10% 19 kV 33%hum)

Con todos los parámetros optimizados se lleva a cabo la producción de fibras con un potencial de 17.5 kV, un poco inferior para evitar el spray de la **Figura 6.38**, obteniéndose fibras con muy buenas características recubriendo toda la superficie de ITO, ver **Figura 6.39**. Esas condiciones óptimas se resumen en la **Tabla 6.8**.

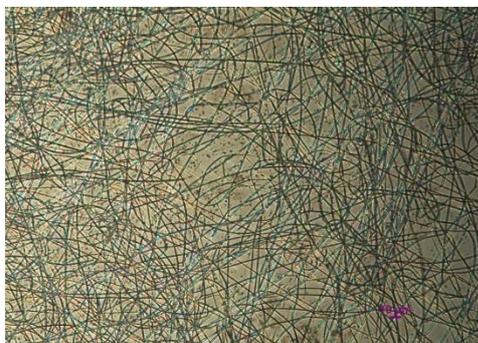


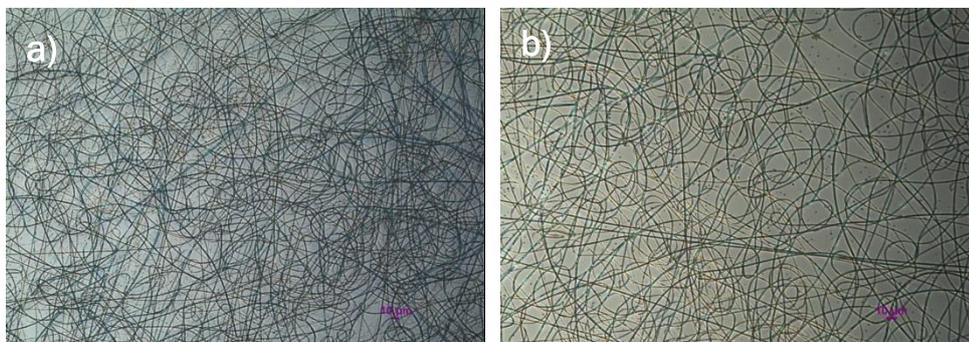
Figura 6.39 (10% 17.5 kV 32%hum)

Concentración (mg/ml)	Caudal (ml/min)	Potencial (kV)	Distancia (cm)	Tiempo (s)	Posición	Temperatura (°C)	Humedad (%)
100	0.01	17-18	12-14	15	Horiz.	22-25	27-33

Tabla 6.8 Mejores condiciones para la obtención de fibras de VKV4-PH-N3 con montaje horizontal.

Electrohilado sobre superficies de vidrio.

Tras la obtención de superficies de ITO recubiertas de fibras, se llevó a cabo la producción de fibras fotosensibles sobre superficies de vidrio de 18 mm de diámetro empleadas para después hacer cultivos celulares sobre ellas. Se mantienen los parámetros de: concentración 10%, flujo 0.01 ml/min, potencial 18 kV, distancia de 12 cm, orientación horizontal y condiciones ambientales similares, utilizados para el recubrimiento de las superficies de ITO y considerados como óptimos para esta técnica. En la **Figura 6.40** se puede observar el recubrimiento de fibras obtenido sobre vidrio con tres aumentos distintos del microscopio.



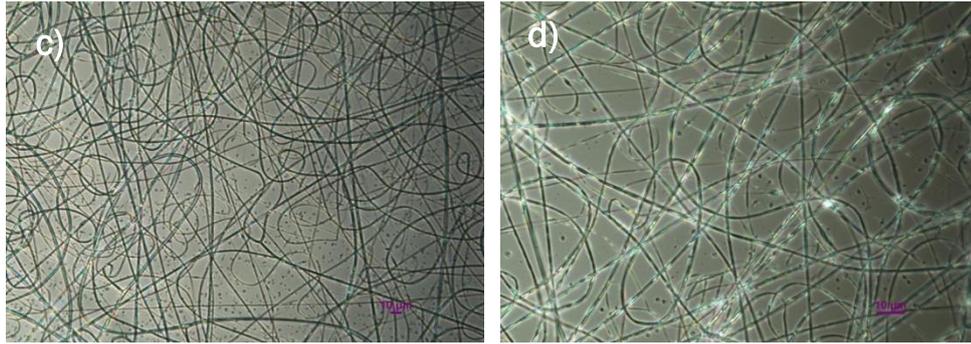


Figura 6.40 (10% 0.01ml/min 18 kV, 12cm, Vidrio) a) x10 b-c) x20 d) x50

En la **Figura 6.41** se observan imágenes de fibras obtenidas en otra muestra bajo las mismas condiciones.

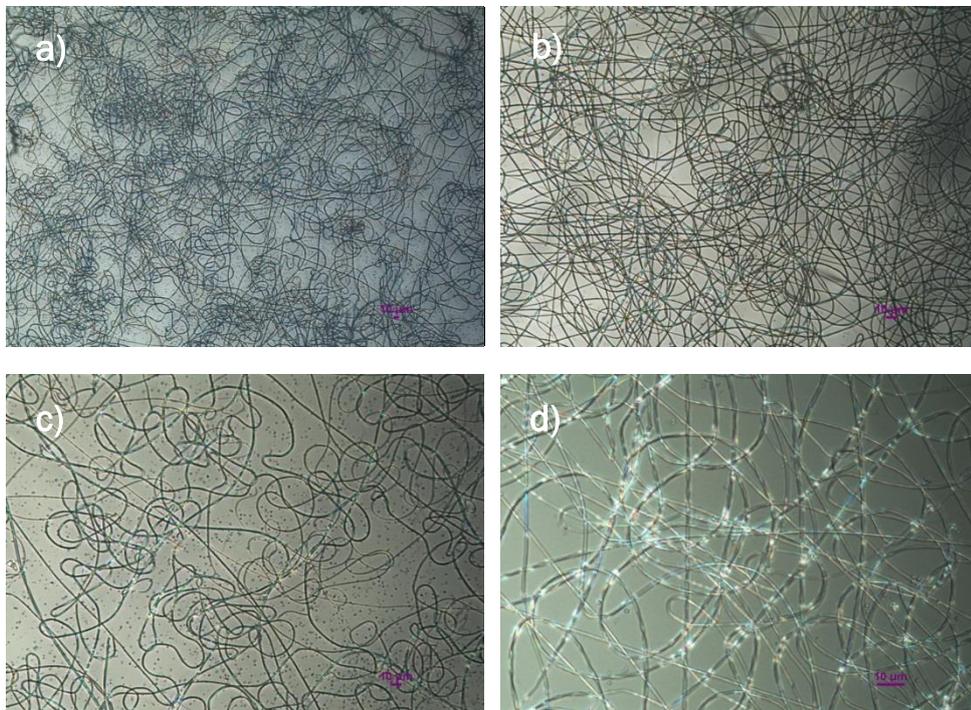


Figura 6.41 (10% 0.01ml/min 18.2 kV, 12cm, Vidrio) a) x10 b-c) x20 d) x50

6.5.3 Entrecruzamiento de fibras fotosensibles

Una vez sintetizadas las fibras del recombinámero modificado con grupos fotosensibles como los fenilazido, VKV₄-PH-N₃, nuestro objetivo fue producir el entrecruzamiento en presencia de luz UV de las fibras obtenidas. El hecho de que se produzca el entrecruzamiento químico de las cadenas de recombinámero hace que las fibras, como ejemplo de elastómero, se conviertan en insolubles en medio acuoso. Esta insolubilidad de las fibras es un requisito necesario para su utilización como material que imita a la matriz extracelular. Así, la irradiación de las fibras con luz UV permite la reacción de

acoplamiento entre grupos fenilazido dando lugar al grupo fenilazobenceno, el cual sirve de nexo de unión entre las cadenas de recombinámero.

Inicialmente se verificó si la luz visible era capaz de producir el entrecruzamiento de las cadenas. Para ello se mantuvo una muestra de ITO con fibras bajo irradiación de la luz visible durante 20 horas. Se comprobó si se había producido el entrecruzamiento mediante el test del agua, es decir, sumergiendo la muestra un total de 20 horas a 4°C y después eliminando el agua en la estufa a 37°C.

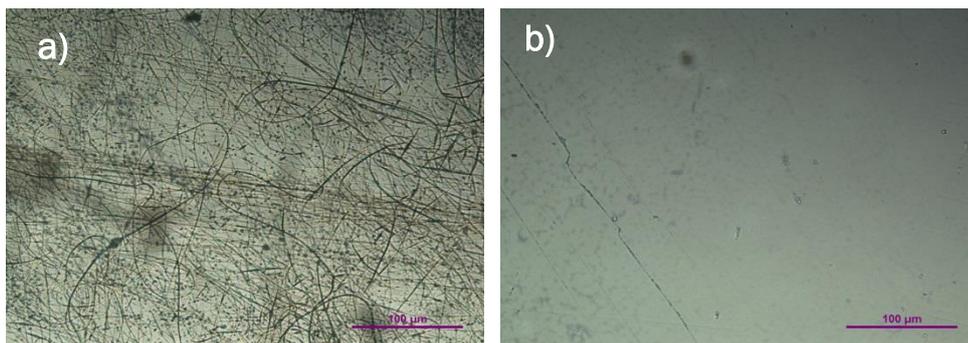


Figura 6.42 a) Muestra con fibras de VKV₄-PH-N₃ después de 20h de luz visible. b) Misma muestra tras 20h en agua milliQ a 4°C.

Como se puede observar en la **Figura 6.42**, las fibras se disolvían en el agua a 4°C, lo que nos permite afirmar que la luz visible no es capaz de producir el entrecruzamiento irreversible de las cadenas.

En experimentos posteriores, se irradió una muestra de fibras con luz UV en el rango de 200 a 400nm durante 50 minutos.. Tras 48 horas de test de solubilidad en agua se comprobó que las fibras eran insolubles y, por tanto, los 50 minutos resultaron un tiempo suficiente para que las fibras se entrecruen en presencia de luz ultravioleta, **Figura 6.43**.

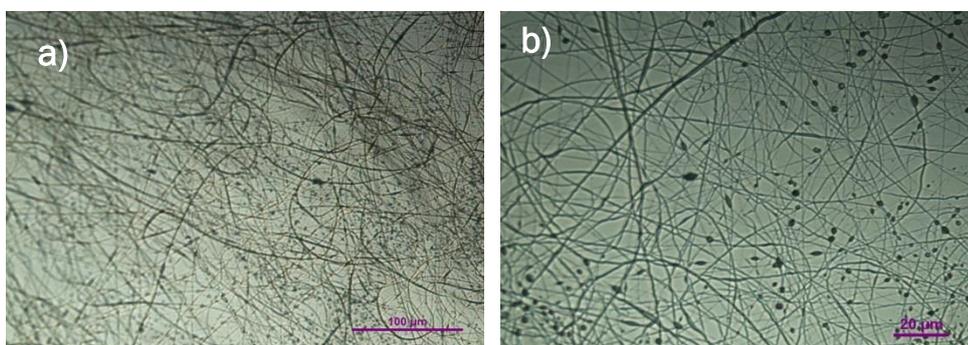


Figura 6.43 a) Muestra con fibras de VKV₄-PH-N₃ después de irradiación UV. b) Misma muestra tras 48h en agua milliQ a 4°C.

Además, se llevó a cabo un seguimiento fotográfico para observar si había cambios significativos en el aspecto de la muestra a simple vista:

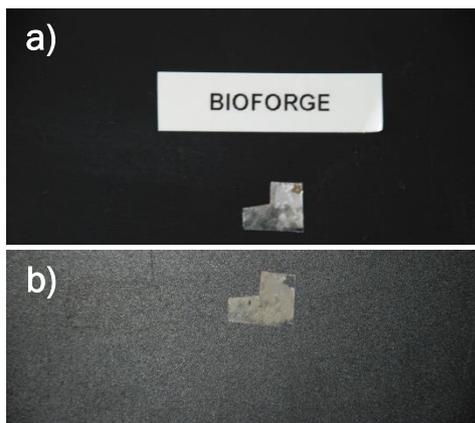


Figura 6.44 a) Muestra antes de irradiación. b) Muestra después de 50' de irradiación UV.

Como se puede apreciar en la **Figura 6.44**, el recubrimiento adquiere un ligero tono amarillento tras la irradiación con la lámpara UV.

Por otro lado, una superficie recubierta totalmente únicamente por spray polimérico, sin llegar a formar fibras, también se somete a irradiación UV y se analiza su solubilidad en agua tras el tratamiento observándose que no se disuelve, ver **Figura 6.45**. Se obtiene, por tanto, una película uniforme como recubrimiento de superficies, de espesor muy fino a la que se pueden dar aplicaciones, por ejemplo, como superficie para cultivo celular.



Figura 6.45 Película formada por spray de VKV₄-PH-N₃ sobre ITO e irradiada con UV.

Tras la comprobación de que las fibras producidas sobre ITO se entrecruzaban con luz UV, el siguiente paso es la determinación del tiempo necesario de irradiación para que eso ocurra. Entonces, se realizó un barrido de tiempos sobre una muestra dividida en 4 fragmentos. Los tiempos de irradiación utilizados fueron: 2, 5, 20 y 60 minutos, ver **Figura 6.46**.



Figura 6.46 4 fragmentos de una misma muestra con tiempos de irradiación UV de 5-2-20-60 minutos respectivamente.

Tras 24h en agua a 4°C, no se disuelven las fibras en ninguno de los 4 fragmentos, por lo que ese puede concluir que un tiempo de 2 minutos de irradiación UV es suficiente para producir el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo, a partir de toda la información recopilada, se lleva a cabo la producción de nanofibras mediante electrohilado en superficies de ITO y de vidrio. Después, se irradian durante 2 minutos bajo un haz de luz UV y, finalmente, se lavan en agua fría al menos durante 20 horas.

A continuación se presentan en las **Figuras 6.47-6.48**, las secuencias de varias muestras.

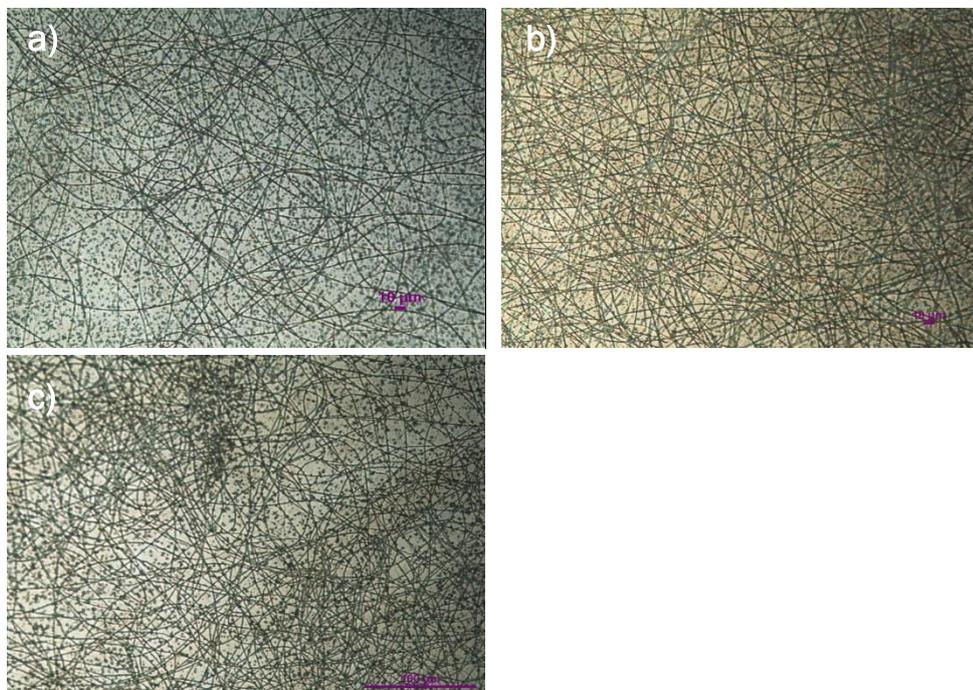


Figura 6.47 Secuencia de seguimiento de una muestra a) Muestra de ITO con fibras de VKV₄-PH-N₃ (x20). b) Muestra tras 2' de irradiación UV (x20). c) Muestra tras 20h en agua a 4°C y secado en estufa a 37°C (x20).

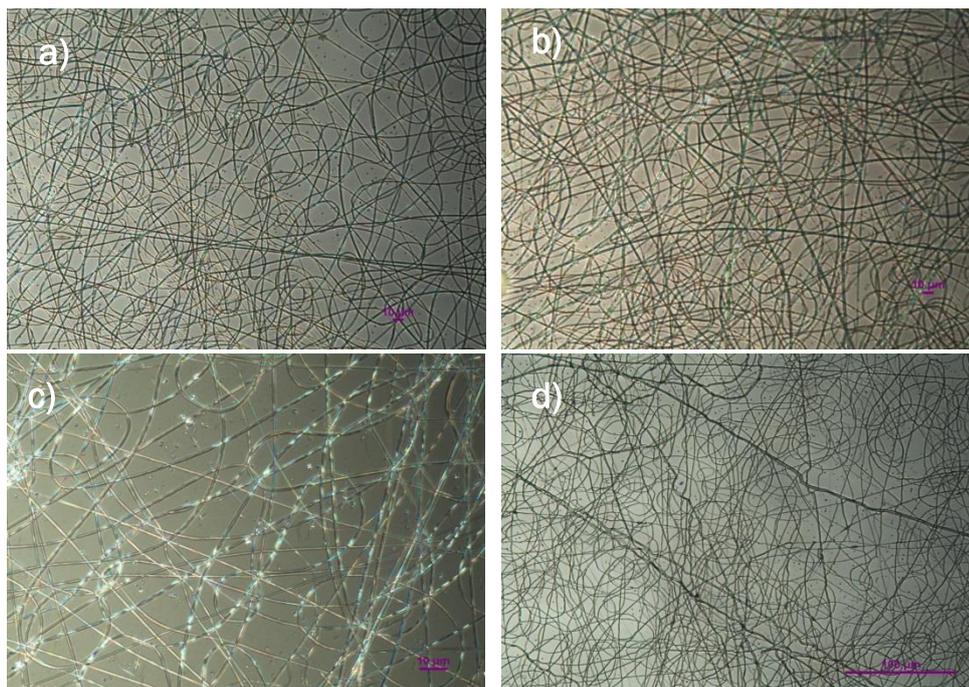


Figura 6.48 Seguimiento de una muestra a) Muestra de VIDRIO con fibras de VKV₄-PH-N₃ tras electrohilado (x20). b-c) Muestra tras 2' de irradiación UV (x20 y x50 respectivamente). d) Muestra tras 20h en agua a 4°C y secado en estufa a 37°C (x20).

En las **Figuras 6.47-6.48**, se pueden observar imágenes de cada una de las etapas del procedimiento experimental llevado a cabo. Analizando los resultados se comprueba que la irradiación UV no conlleva cambios en el aspecto de las fibras puesto que en las fotografías realizadas no se observan diferencias significativas entre las muestras antes y después de la irradiación. Además, se comprueba con las imágenes después del lavado como las fibras son insolubles tras la irradiación UV.

6.5.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM) se visualizan las fibras fotosensibles de las muestras obtenidas en las condiciones consideradas como óptimas (**Tabla 6.8**, apartado 6.5.2.2) con una mayor capacidad de resolución y profundidad de campo. En las imágenes obtenidas se aprecia la morfología de las estructuras fibrosas preparadas. A continuación mediante las imágenes de microscopía electrónica se contrasta la morfología observada en microscopía óptica:

- **Figura 6.49.** Corresponden con fibras de VKV₄-PH-N₃ antes de la irradiación UV y el lavado. Se observa como las fibras están despegadas de la superficie y superpuestas, además de la presencia de restos de defectos que serán eliminados tras el lavado.

- **Figura 6.50-6.51.** Corresponden con fibras de VKV₄-PH-N₃ entrecruzadas tras irradiación y lavado. Se puede apreciar que la morfología de las fibras es redondeada con diámetros dentro del rango de [0.4 μm – 1 μm].

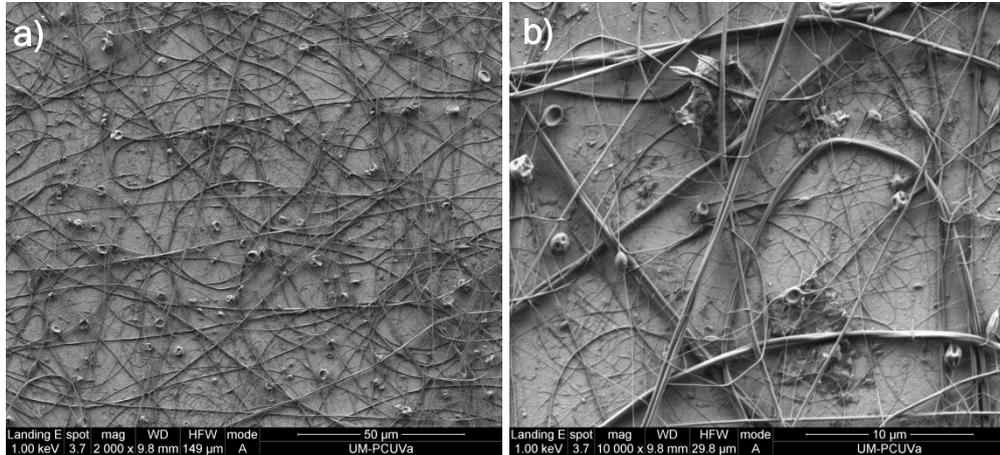


Figura 6.49 Fibras de VKV₄-PH-N₃ sin irradiar con UV.

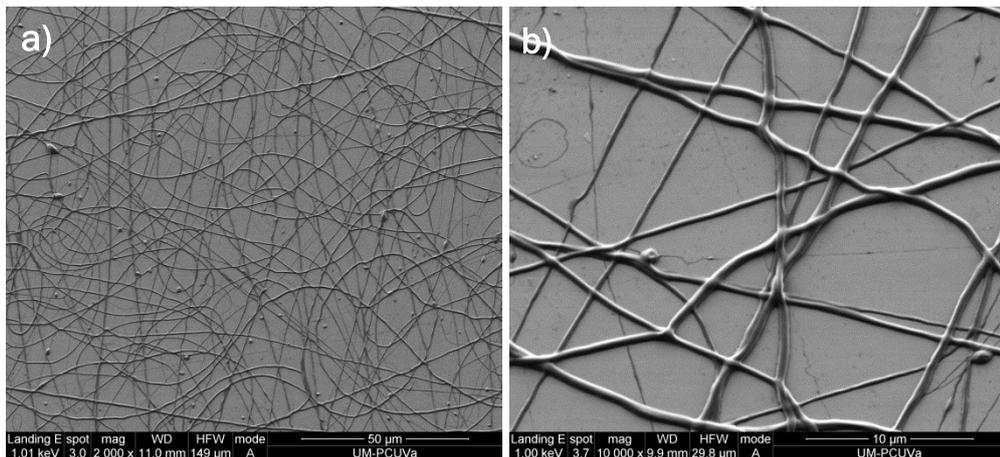


Figura 6.50 Fibras de VKV₄-PH-N₃ tras irradiación UV.

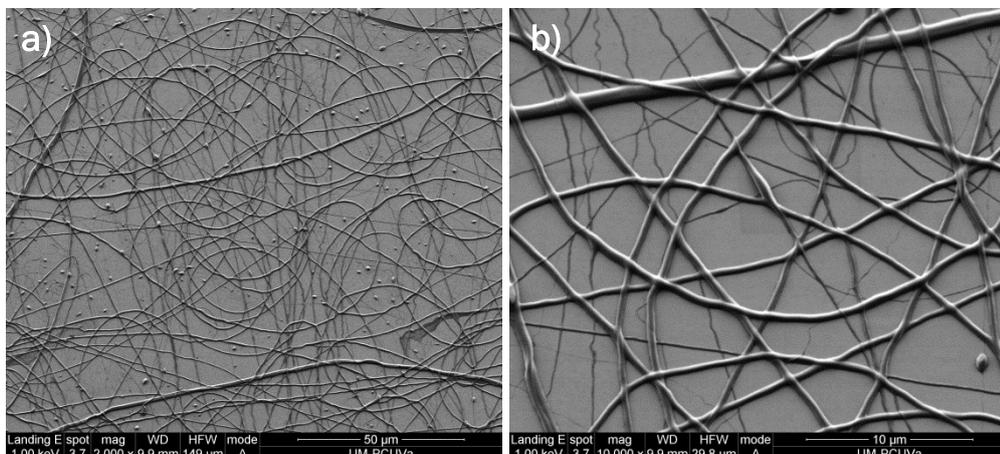


Figura 6.51 Fibras de VKV₄-PH-N₃ tras irradiación UV.

6.5.5 Medida Ángulo de contacto

Se analizan las diferencias entre las superficies recubiertas en las distintas etapas del proceso llevado a cabo, mediante la medida del ángulo de contacto de 5 gotas por cada superficie, ver **Figura 6.52**.

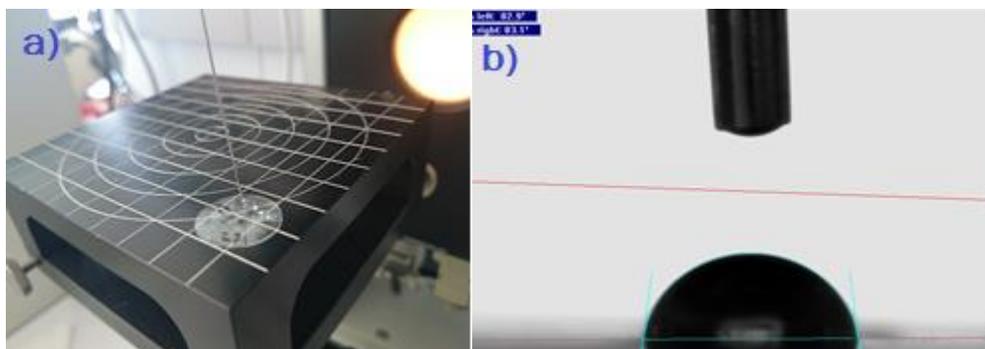


Figura 6.52 a) La aguja depositando una gota sobre la superficie. b) Imagen de la aguja y la gota sobre la superficie mediante el Software SCA20.

En primer lugar, la medida del ángulo de contacto medio para una superficie de ITO recubierta con fibras de VKV₄ sin modificar y por tanto sin irradiar con UV, ver **Tabla 6.9**.

Superficie	Polímero	Recubrimiento	Tratamiento	Ángulo de contacto medio (°) +SD
ITO	VKV ₄	Fibras	No modificado / no irradiado UV	73.97 ±1.07

Tabla 6.9 Medidas de ángulo de contacto sobre las superficies obtenidas mediante electrohilado de VKV₄.

En segundo lugar, la medida del ángulo de contacto se realiza en las superficies de ITO y vidrio recubiertas de fibras por el polímero VKV₄-PH-N₃ en distintas etapas, es decir antes y después de la irradiación UV, y después del lavado con MQ, ver **Tabla 6.10**.

Además, se mide el ángulo de contacto a modo de comparación en una superficie recubierta con una fina película de fibras pequeñísimas o spray y en una superficie recubierta de forma muy irregular por fibras.

Superficie	Polímero	Recubrimiento	Tratamiento	Ángulo de contacto medio (°) +SD
ITO	VKV ₄ -PH-N ₃	Fibras	No Irradiado UV	72.51 ±0.76
ITO	VKV ₄ -PH-N ₃	Fibras	Irradiado UV/No lavado MQ	74.13 ±2.23

ITO	VKV ₄ -PH-N ₃	Fibras	Irradiado UV/Lavado MQ	82.16 ±4.91
ITO	VKV ₄ -PH-N ₃	Fibras	Irradiado/Lavado MQ (irreg.)	88.72 ±1.95
ITO	VKV ₄ -PH-N ₃	Película-spray	Irradiado UV/Lavado MQ	86.67 ±3.84
Vidrio	VKV ₄ -PH-N ₃	Fibras	Irradiado UV/Lavado MQ	81.48 ±4.23

Tabla 6.10 Medidas de ángulo de contacto sobre las superficies obtenidas mediante electrohilado de VKV₄-PH-N₃.

La medida de los ángulos de contacto permite comprobar experimentalmente las diferencias entre los distintos recubrimientos y tratamientos utilizados.

Así, el ángulo de contacto medio de valor más bajo obtenido corresponde a las superficies recubiertas con fibras del polímero VKV₄ (73.97°) y VKV₄-PH-N₃ sin irradiar (72.51°). Estos resultados son lógicos puesto que no existe entrecruzamiento en las cadenas poliméricas de esas fibras y se disuelven en agua fría. Debido a una mayor afinidad que en el resto de superficies la gota de agua milliQ se expande más.

El resto de medidas corresponden al polímero VKV₄-PH-N₃ irradiado con luz UV, por lo que ha tenido lugar el entrecruzamiento de los grupos fenilazido. En las superficies irradiadas y lavadas se comprueba que el ángulo de contacto obtenido (>80°) es mayor que en las experiencias no irradiadas debido al entrecruzamiento de las cadenas poliméricas que hace que las nanofibras sean insolubles en agua y disminuya así su afinidad al ponerlas en contacto.

Los resultados obtenidos utilizando las superficies de vidrio son del mismo orden (>80°) que con el ITO descartando entonces que el material que sirve de soporte del recubrimiento afecte en la medida del ángulo de contacto.

6.5.6 Ensayos Celulares

Anteriormente se han preparado superficies de vidrio recubiertas de nanofibras del polímero fotosensible VKV₄-PH-N₃, sobre las se han realizado unos cultivos celulares de fibroblastos, una vez han sido irradiados con luz UV.

Mediante estos ensayos se pretende un objetivo principal de comprobar la viabilidad y citocompatibilidad con las células además de observar en el

caso de que sean compatibles, si existe adhesión celular a las fibras a pesar de no tener un dominio específico para ello.

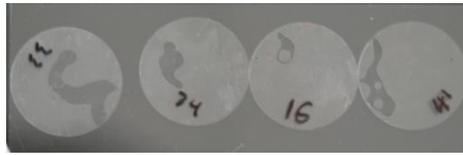
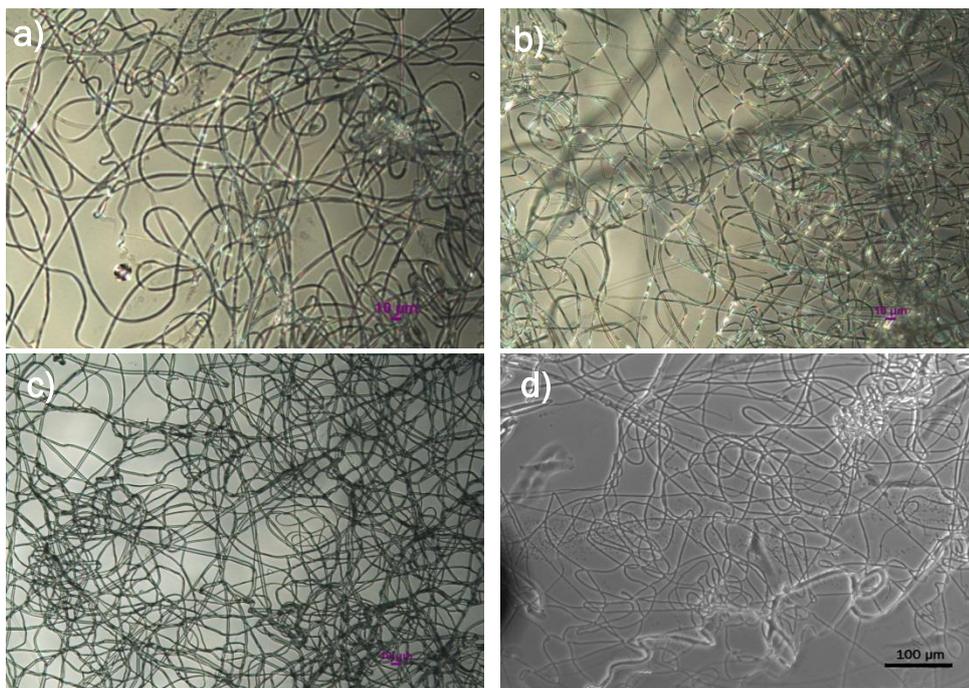


Figura 6.53 Superficies de vidrio recubiertas de fibras tras el proceso de irradiación y lavado con algo de humedad, antes del cultivo celular en la placa de 12 pocillos.

A continuación, al igual que en el apartado anterior, se efectúa un seguimiento completo, mediante imágenes de microscopio óptico, de las superficies, incluyendo las etapas de: recubrimiento con nanofibras, irradiación, lavado con agua, el cultivo de los fibroblastos, la fijación de las células por tratamiento con paraformaldehído y por último la tinción del núcleo con 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) y del citoplasma celular con Faloidina-Alexa Fluor488.

Seguimiento Superficie 1:



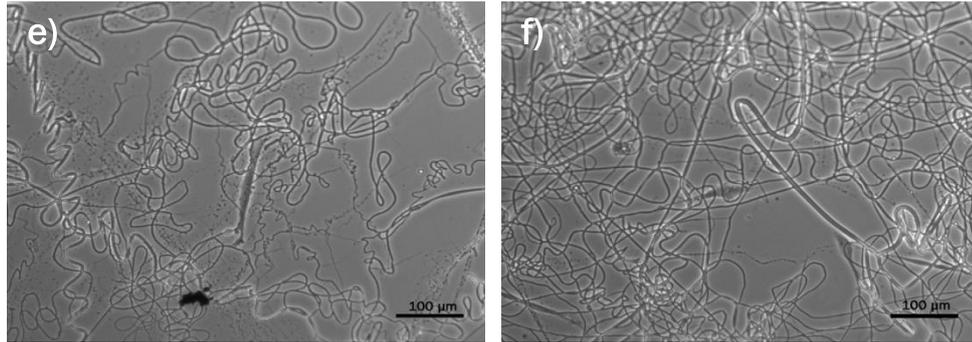


Figura 6.54 Secuencia de seguimiento de una muestra a) Muestra de VIDRIO con fibras de VKV₄-PH-N₃ tras electrohilado (x20). b) Muestra tras 2' de irradiación UV (x20). c) Muestra tras 20h en agua a 4°C y secado en estufa a 37°C (x20). d-e-f) Muestra tras 24h de cultivo celular (x20).

Seguimiento Superficie 2:

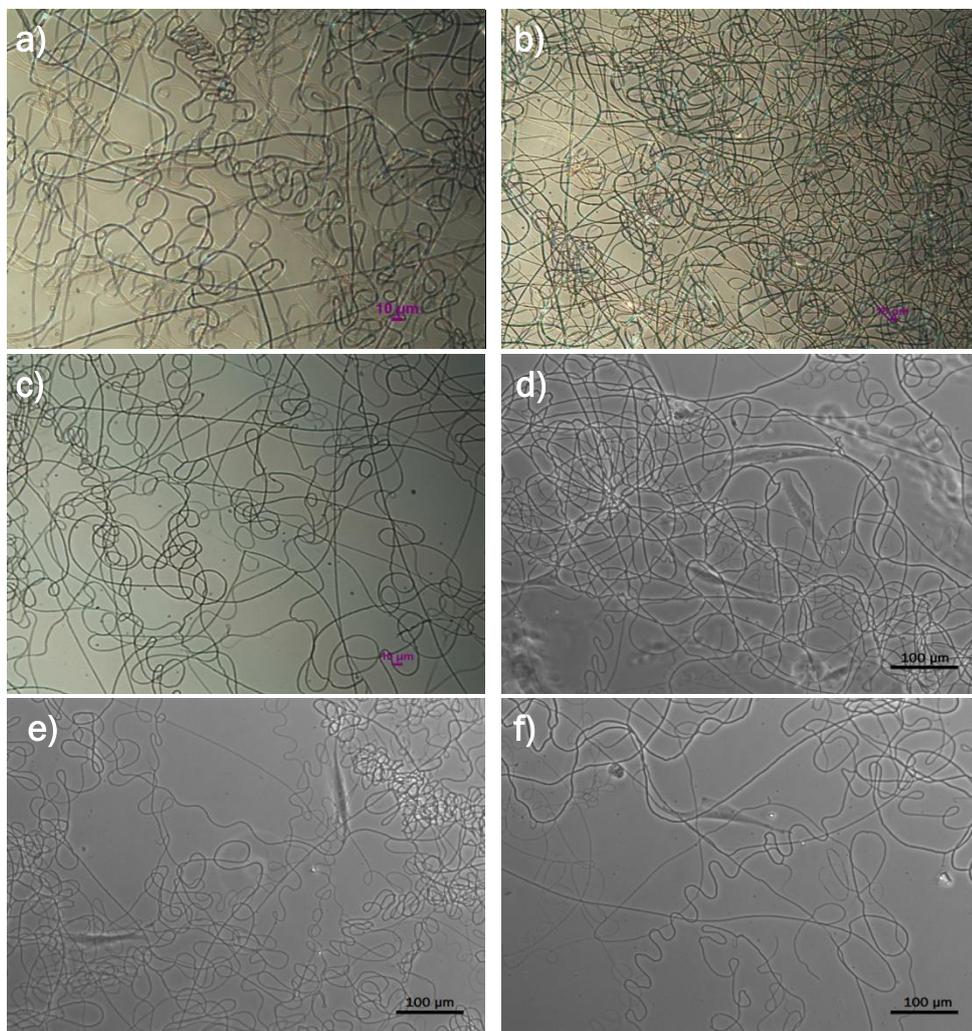


Figura 6.55 Secuencia de seguimiento de una muestra a) Muestra de VIDRIO con fibras de VKV₄-PH-N₃ tras electrohilado (x20). b) Muestra tras 2' de irradiación UV (x20). c) Muestra tras 20h en agua a 4°C y secado en estufa a 37°C (x20). d-e-f) Muestra tras 24h de cultivo celular (x20).

Seguimiento Superficie 3:

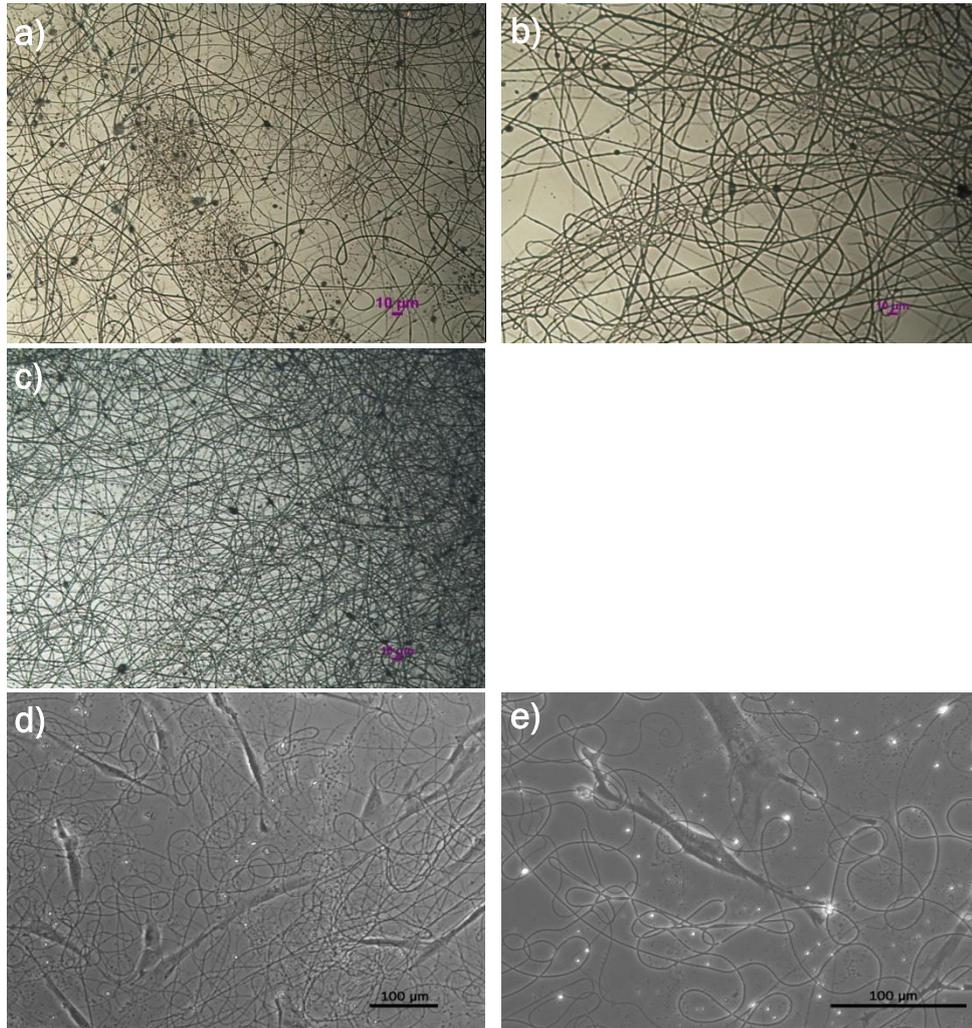


Figura 6.56 Secuencia de seguimiento de una muestra a) Muestra de VIDRIO con fibras de VKV₄-PH-N₃ tras electrohilado (x20). b) Muestra tras 2' de irradiación UV (x20). c) Muestra tras 20h en agua a 4°C y secado en estufa a 37°C (x20). d-e) Muestra tras 24h de cultivo celular (x20 y x50).

En las imágenes de los cultivos celulares de las **Figuras 6.54-6.55-6.56**, se puede observar el crecimiento de las células sobre las muestras.

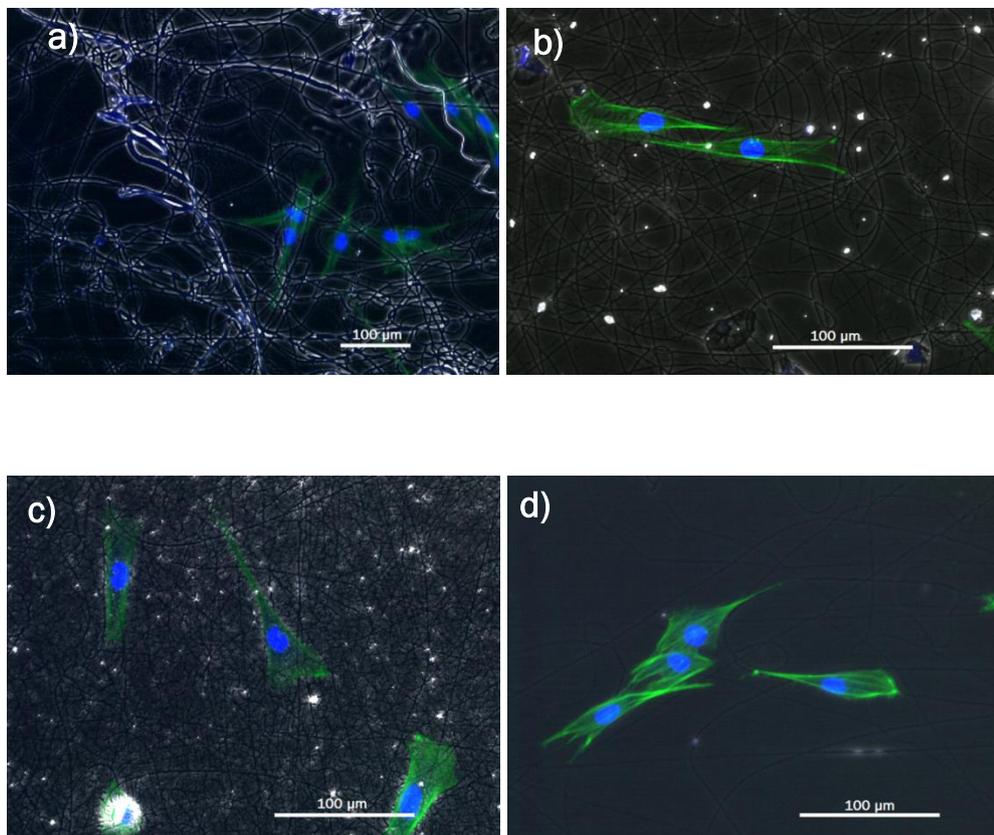
Inicialmente las células no adheridas presentan una morfología redondeada y brillante, sin embargo durante el proceso de adhesión esas células adquieren formas alargadas, extendidas y oscuras

La adhesión pasiva producida por fuerzas electrostáticas entre las fibras y las células es la que permite la atracción y el crecimiento celular adoptando, en muchos casos, la forma de las fibras de su alrededor o conectando sus filopodios a ellas.

La adhesión y el estiramiento celular son observables en las **Figuras 6.54-e, 6.55-e-f, 6.56-e**. En la **Figura 6.55-d** se contempla claramente cómo una de las células crece adoptando la forma curva de una fibra.

El crecimiento y desarrollo celular observado permite garantizar la citocompatibilidad entre las nanofibras poliméricas y las células, lo cual es un hecho muy importante puesto que permite seguir trabajando en este sentido e impulsar el desarrollo de ensayos celulares sobre superficies con estos materiales sin problemas de toxicidad.

A continuación se muestran, en la **Figura 6.57**, las imágenes del microscopio una vez finalizado el cultivo celular tras 48 horas y después de la tinción del núcleo (azul) y citoplasma celular (verde) con reactivos fluorescentes.



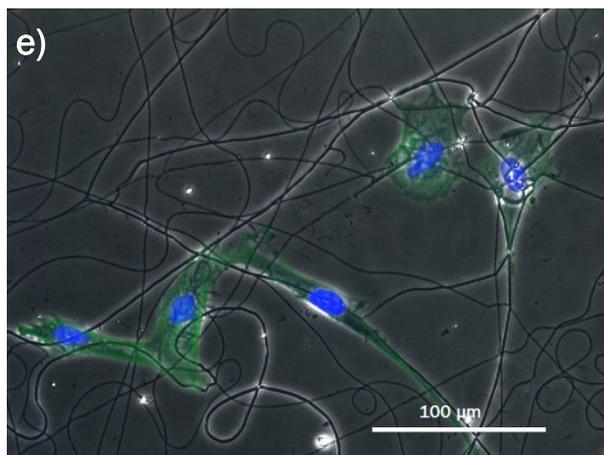


Figura 6.57 Células sobre las fibras de VKV₄-PH-N₃ tras 48h de cultivo celular y tinción del núcleo (azul) y citoplasma celular (verde).

En las imágenes de la **Figura 6.57**, se pueden observar claramente la forma extendida del citoplasma celular y la adhesión pasiva con las fibras, que permite que adopten esa forma.

En la **Figura 6.57-c-b** debido a la gran densidad de fibras presentes en la superficie es más complicado observar la adhesión. No obstante, se puede comprobar cómo tienen formas muy estiradas y tomando formas concretas según las fibras que las rodean.

La **Figura 6.57-e**, es una imagen muy representativa de esta adhesión celular puesto que permite observar una célula con la forma alargada de la fibra, y el resto adheridas en algún punto o encajadas entre varias fibras.

A continuación mediante las imágenes de microscopía electrónica se contrasta la morfología observada en microscopía óptica:

- **Figura 6.58-6.59.** Corresponden con fibras fotosensibles previamente entrecruzadas por irradiación UV, y sobre las que se ha llevado a cabo el cultivo celular de fibroblastos. Al finalizar el cultivo, las células se fijan para poder analizarlas por microscopía. El recombinámero utilizado para preparar las fibras no posee dominio bioactivo de adhesión celular. Sin embargo, según se aprecia en las fotografías, la adhesión pasiva permite que los fibroblastos se adhieran siguiendo la forma de las fibras; observándose incluso cómo se encajan entre las fibras o conectan sus filopodios en puntos de fibras cercanas.
- **Figura 6.60.** Corresponde con fibras fotosensibles entrecruzadas por irradiación UV y sobre las que se ha llevado a cabo el cultivo celular de fibroblastos. En este caso, el último lavado de las células fijadas fue insuficiente, y la muestra presenta restos de sales tras el cultivo celular,

obteniéndose una imagen en la que se muestra cómo los cristales de fosfatos formados se encuentran depositados sobre las células y las fibras.

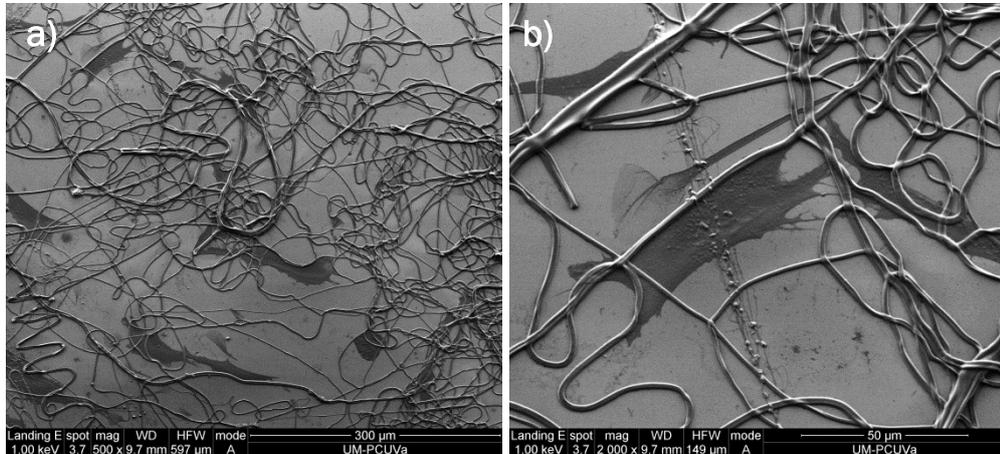


Figura 6.58 Fibras entrecruzadas de VKV₄-PH-N₃ con fibroblastos.

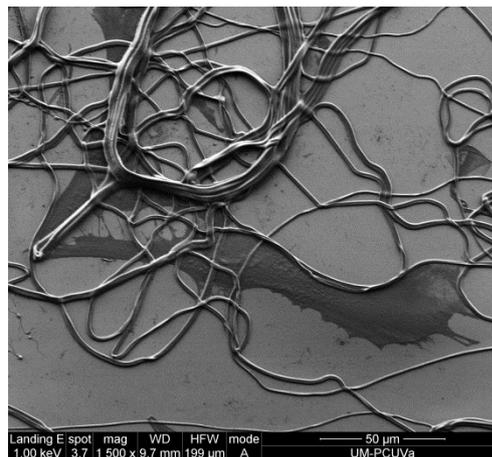


Figura 6.59 Fibroblasto siguiendo la línea de las fibras de VKV₄-PH-N₃.

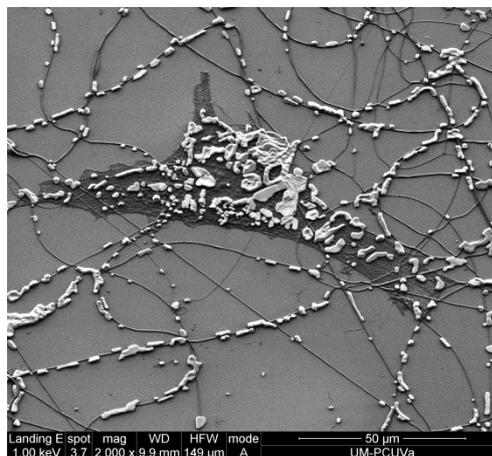


Figura 6.60 Fibroblasto unido a las fibras de VKV₄-PH-N₃ con restos salinos.

En **líneas futuras** de trabajo en el laboratorio se plantea el desarrollo del mismo procedimiento que el realizado en este TFG, partiendo de nanofibras de un polímero que contenga una secuencia de adhesión celular, como el HRGD6, y que permita la adhesión activa con los receptores de las integrinas celulares. El polímero se modificaría igualmente con el grupo fotosensible fenil azido para obtener superficies de fibras monocomponente, entrecruzadas por luz UV y que permitan el crecimiento de las células adheridas a lo largo de las fibras.

Otro punto importante, que se podría plantear para su desarrollo, es la obtención de nanofibras alineadas sobre la superficie, en una misma orientación, ya que actualmente se tienen en posiciones aleatorias.

ESTUDIO ECONÓMICO

7. ESTUDIO ECONÓMICO

Este Trabajo Fin de Grado (TFG), como cualquier otro proyecto, requiere un estudio de los costes derivados de la obtención de superficies recubiertas de nanofibras a partir de biopolímeros modificados químicamente. El estudio económico global del trabajo permite el análisis de la viabilidad del proyecto y los resultados obtenidos así como obtener un precio de estos productos finales.

Dentro de este estudio, la determinación del coste global, se realiza teniendo en cuenta los siguientes apartados de costes:

- Material
- Reactivos
- Equipos
- Personal
- Instalación
- Servicios adicionales

Se estudian por tanto los costes derivados de las siguientes etapas: bioproducción del polímero VKV₄, modificación química del polímero introduciendo el grupo fenilazido (VKV₄-PH-N₃), producción de fibras mediante electrohilado, además de la irradiación para el entrecruzamiento.

7.1 COSTE DEL MATERIAL

El material utilizado en el laboratorio para la elaboración del TFG, se recoge en las **Tablas 7.1 y 7.2**, referentes al material desechable y aquel de varios usos.

Se determina a partir de los costes unitarios, el coste total anual total de estos materiales para la producción del hidrogel.

Material desechable	Coste unitario (€)	Unidades	Coste total (€/año)
Agujas (100 ud)	13.10	4	52.40
Eppendorf 1.5 ml	0.047	200	9.40
Eppendorf ámbar 2ml	0.055	150	8.25
Falcon	0.267	300	80.10
Guantes (100 ud)	2.10	4	8.40
Óxido Indio-Estaño (ITO)	25.50	5	127.50
Jeringuillas (100 ud)	20.94	4	83.76
Papel aluminio	11.46	3	34.38

Parafilm	26.02	1	26.02
Pipeta Pasteur	0.035	100	3.50
Placa Petri	0.227	12	2.72
Puntas pipetas 1000µL	0.036	400	14.40
Puntas pipetas 200µL	0.016	200	3.20
Vidrio 18mm (1000ud)	90.71	10	907.10
Tripas diálisis (60m)	86	1	86
TOTAL			1447.13 €

Tabla 7.1 Relación de material desechable utilizado y coste económico.

Material varios usos	Coste unitario (€)	Uds	Amortización (años)	Coste total (€/año)
Aguja metálica	73.08	1	1	73.08
Bidón diálisis (25L)	11.37	2	1	22.74
Caja metacrilato	42.50	1	1	42.50
Conectores capilar	3.78	5	1	18.90
Embudo	8.63	1	1	8.63
Erlenmeyer (100ml)	4.17	2	1	8.34
Erlenmeyer (250 ml)	4.40	2	1	8.80
Espátula	29	1	1	29
Frasco lavador	3.6	4	1	14.40
Gradilla	4.2	1	1	4.20
Imanes de agitación	3.5	2	1	7
Matraz aforado (25ml)	18.50	2	1	37
Matraz aforado (50ml)	21.70	2	1	43.40
Matraz afo. ámbar (25ml)	9.56	2	1	19.12
Micropipeta	182.70	1	2.5	73.08
Pinzas de campana	16.25	1	1	16.25
Porta (50 uds)	2.60	1	1	2.60
Probeta (100ml)	5.60	1	1	5.60
Tijeras	4.60	1	1	4.60
Tubos capilares (1m)	9.58	1	1	9.58
Vaso precipitados (100ml)	3.80	2	1	7.60
Vaso precipitados (250ml)	4.14	1	1	4.14
TOTAL				460.56 €

Tabla 7.2 Relación de material reutilizable y coste económico.

La estimación anual del gasto en material de laboratorio reutilizable es de 460.56 €, mientras que de material desechable asciende a 1447.13 €.

7.2 COSTE DE REACTIVOS

El coste de reactivos implica todos aquellos consumidos en el proceso de modificación química del biopolímero y en la síntesis del hidrogel. Se toma como reactivo el biopolímero sintetizado en la etapa de bioproducción en el propio laboratorio, al cual se asocian los costes determinados de producción.

En la **Tabla 7.3** se encuentra la relación los reactivos utilizados en la modificación del polímero y el electrohilado así como el coste asociado tomando como base de cálculo 1g de polímero. Se enuncia también la etapa correspondiente a su utilización.

Proceso utilizado	Reactivos	Coste envase (€)	Coste unitario (€/mg-ml)	Cantidad envase (mg-ml)	Cantidad utilizada (mg-ml)	Coste Total (€/año)
Modificación VKV ₄	VKV ₄	110.20	1.102	100	1000	1102
Modificación VKV ₄	Ácido 4-azidobenzoico	298.50	5.970	50	12	71.64
Modificación VKV ₄	DCC	59.60	0.596	100	612.33	364.95
Modificación VKV ₄	DCM	58	0.023	2500	12.50	0.29
Modificación VKV ₄	Trifluoroetanol (TFE)	230	0.460	500	26.60	12.24
Lavado de reacción	Dietiléter	76	0.030	2500	240	7.20
Lavado de reacción	Acetona	76.80	0.030	2500	120	3.60
Electrohilado	Trifluoroetanol (TFE)	230	0.460	500	12	5.52
TOTAL						1567.44€

Tabla 7.3 Relación de reactivos empleados y coste económico.

El coste derivado de la modificación química y utilización de una cantidad de referencia de 1000mg de polímero para la producción de fibras es de 1567.44 €/g.

7.3 COSTE DE LOS EQUIPOS

El coste de los equipos se considera mediante amortizaciones de 10 años, para todos los equipos del laboratorio, excepto para los equipos informáticos que se considera de 5 años.

En la **Tabla 7.4** se muestran los equipos utilizados a lo largo de todo el proceso así como el coste anual asociado en función de la amortización.

Equipo	Precio (€)	Vida útil (años)	Coste anual (€/año)
Agitador magnético	350	5	70
Balanza	2520	10	252
Bomba	1500	10	150
Bomba electrohilado	5302.11	10	530.21
Cámara Fría	20000	10	2000
Centrífuga	1430	10	143
Congelador	800	10	80
Cronómetro	11.40	10	1.14
Dispensador agua dest.	3700	10	370
Dispensador MilliQ	4500	10	450
DSC	35000	10	3500
Estufa	1200	10	120
Frigorífico	600	10	60
FTIR	12000	10	1200
Fuente de alta tensión	5109.73	10	510.97
Generador de hielo	590	10	59
Lámpara UV (Hg)	308	10	30.80
Liofilizador	23490	10	2349
Microscopio Óptico	11900	10	1190
Ordenador	700	5	140
pHmetro	3057	10	305.70
TOTAL			13511.80 €

Tabla 7.4 Relación de equipos utilizados y coste económico.

Se consideran aparte los costes de los equipos de MALDI-ToF, RMN y SEM puesto que son servicios externos al laboratorio. Por tanto se determina el coste anual a partir del número de muestras analizadas y el coste por muestra en la **Tabla 7.5**.

Equipo	Precio por muestra(€)	Muestras por año	Coste anual (€/año)
MALDI-ToF	7.50	20	150
RMN	1.00	50	50
SEM	16.00	125	2000
TOTAL			2200

Tabla 7.5 Coste asociado a servicios externos al laboratorio.

El coste total anual de equipos es de 15711.80 €, y corresponde a la suma del equipamiento de laboratorio utilizado, más los servicios de equipos externos requeridos.

7.4 COSTE DEL PERSONAL

En este apartado se calculan los costes debidos al personal cualificado requerido para las etapas de modificación del biopolímero y síntesis de fibras.

El coste de este personal se determina en función de las horas necesarias para cada una de las etapas citadas anteriormente. Se estiman necesarias unas 6 horas diarias de jornada laboral de únicamente un operario.

Este operario deberá tener una cualificación mínima necesaria de diplomado en Ingeniería Técnica Industrial, lo cual supone aproximadamente unos costes por persona y jornada completa de 25000€.

Teniendo en cuenta el salario del operario encargado del proceso y las horas necesarias estimadas para llevarlo a cabo se estima un coste anual de 18750€. Por tanto el desglose del salario bruto y los costes de la S. S. se muestran en la **Tabla 7.6**.

	Coste (€/año)
Sueldo Anual Bruto	13889
Seguridad Social (35%)	4861
Sueldo Anual Total	18750

Tabla 7.6 Relación de costes asociados al sueldo del operario de laboratorio.

7.5 COSTE DE LA INSTALACIÓN

En este apartado se recogen los gastos de alquiler del recinto utilizado como laboratorio en el Edificio Lucía. El coste del alquiler de un laboratorio pequeño de unos 70 m² por la zona del Campus Miguel Delibes de Valladolid es de 500 €/mes, por lo que los costes anuales debidos a la localización son de 6000 €/año.

7.6 COSTE INDIRECTOS DE SERVICIOS

El laboratorio requiere de servicios básicos de agua, electricidad y calefacción para el correcto funcionamiento de las instalaciones. Además de servicio de limpiezas y mantenimiento que aseguren buenas condiciones de trabajo. Se consideran también los costes administrativos del laboratorio.

Todo esto proporciona unos costes indirectos al estudio económico estimados en unos 500 €/mes. Con lo que el coste anual final de estos servicios es de 6000 €/año.

7.7 COSTES TOTALES

El coste total del proyecto viene determinado por la suma de todas las partidas especificadas, es decir coste de material, de reactivos, de equipos, de personal, de instalación y de servicios indirectos.

Se determina el precio unitario de las superficies recubiertas de nanofibras en la **Tabla 7.7**, mediante el coste total y el cálculo de la producción anual de superficies.

Días laborables al año	250	días
Superficies diarias producidas	40	sup./día
Vidrio	30	sup./día
ITO	10	sup./día
Producción superficies anuales	10000	sup./año
Polímero modificado útil diario	0.10	g/día
Polímero modificado útil anual	25	g/año
Coste reactivos:		
1g de polímero utilizado	1567.44	€
25g de polímero (anual)	39186	€/año
Coste material de laboratorio	1907.69	€/año
Coste amortización de equipos	15711.82	€/año
Coste del personal	18750	€/año
Coste de la instalación	6000	€/año
Coste de servicios indirectos	6000	€/año
COSTE TOTAL ANUAL	87555.51	€/año
+30% Beneficio	113822.16	€/año
+21% IVA	137724.82	€/año
PRECIO UNITARIO DE SUPERFICIE	13.77	€/sup

Tabla 7.7 Resumen del análisis económico, costes totales y unitarios.

El precio unitario de cada superficie recubierta de nanofibras producida en el G.I.R. BIOFORGE es de 13.77 €/ud con una producción anual de 10.000 superficies de 2.55 cm²/ud. Se ha realizado una comparación de este precio con el de otros productos ya comercializados de características y propiedades similares, aunque no fotosensibles. Por ejemplo, las superficies recubiertas de nanofibras de ácido poliláctico (PLLA) producidas por Mimetix® de Electrospinning Company Ltd (UK) tienen un precio de 15.55 €/ud de igual superficie, siendo un valor muy similar al obtenido.

ESTUDIO SEGURIDAD

8. ESTUDIO DE SEGURIDAD

8.1 INTRODUCCIÓN

Por sus propias características, el trabajo en el laboratorio presenta una serie de riesgos de origen y consecuencias muy variadas, relacionados básicamente con las instalaciones, los productos que se manipulan y las operaciones básicas que se realizan con ellos. Con respecto a los productos debe tenerse en cuenta que suelen ser muy peligrosos, aunque normalmente se emplean en pequeñas cantidades y de manera discontinua.

En consecuencia, la prevención de los riesgos en el laboratorio presenta unas características propias que la diferencian de otras actividades laborales. Por otro lado, la implantación de criterios para asegurar la calidad, lleva implícita la aplicación de una política de seguridad. La experiencia y la estadística demuestran que los laboratorios en los que se han implantado una política de calidad presentan un aumento en el nivel de seguridad.

El plan de seguridad exige, el cumplimiento de las normas establecidas, relacionadas con la seguridad y la prevención de riesgos laborales, y la reglamentación específica (sustancias radiactivas, cancerígenas, agentes biológicos, etc), de seguridad industrial, de emisiones y vertidos, etc.

En este estudio se aborda el riesgo químico, teniendo en cuenta aspectos estrechamente relacionados, como ciertos equipos de trabajo, campanas o vitrinas de laboratorio además de medidas generales de seguridad en el laboratorio[104].

8.1.1 Responsabilidad del Director del Laboratorio

Aunque la Universidad disponga del Comité de Seguridad y Salud, de un Servicio de Prevención, es responsabilidad del director del laboratorio el desarrollo de la gestión de prevención de riesgos, debiendo tenerse en cuenta lo dispuesto al respecto por la Ley 31/1995 de Prevención de Riesgos Laborales y el Reglamento de los Servicios de Prevención (RD 39/1997), tanto en lo que afecta a los trabajadores de plantilla del laboratorio, como para aquellos externos que desarrollen sus actividades en el mismo de manera esporádica, temporal o fija.

8.1.2 Plan de evacuación-emergencia-seguridad

El laboratorio debe disponer de su propio plan de emergencia o estar incluido en el del edificio en el que se halle ubicado. El desarrollo del plan de emergencia lleva implícita una política sobre protección de incendios, evacuación y señalización contenida en la NBE-CPI/96 y anteriores y en los RR DD 485/1997 sobre señalización y 486/97 sobre lugares de trabajo. Asimismo, requiere contemplar la evaluación del riesgo, los medios de protección existentes, un programa de implantación con simulacros periódicos para comprobar la eficacia del plan, la organización de un equipo de primera intervención, etc.

8.1.3 Evaluación de riesgos de un laboratorio

El laboratorio debe haber realizado la evaluación inicial de riesgos y actualizarla cuando cambien las condiciones de trabajo y siempre que se detecten daños para la salud. Como guía para la evaluación de los riesgos en el laboratorio se pueden considerar los siguientes factores de riesgo:

- Desconocimiento de las características de peligrosidad de las sustancias.
- Empleo de métodos y procedimientos de trabajo intrínsecamente peligrosos.
- Malos hábitos de trabajo.
- Empleo de material de laboratorio inadecuado o de mala calidad.
- Instalaciones defectuosas.
- Diseño no ergonómico y falta de espacio.
- Contaminación ambiental.

De una manera general, las acciones preventivas para la minimización de los riesgos causados por estos factores son:

- Disponer de información sobre las características de peligrosidad de las sustancias.
- Disponer de la adecuada información para realizar el trabajo de manera segura.
- Adquirir y mantener buenas prácticas de trabajo.
- Trabajar con material suficiente y adecuado a las necesidades y en buen estado.
- Llevar una buena política de mantenimiento preventivo, con revisiones periódicas, y reparar con rapidez las averías.

- Considerar los aspectos de seguridad (estructural, de diseño y de distribución) en la fase de diseño. No acumular materiales en las superficies de trabajo. Disponer del espacio de una manera racional.
- Equipar el laboratorio con un sistema de ventilación general, localizada (vitriñas y cabinas) y de emergencia eficaz.

8.2 ORGANIZACIÓN Y RECOMENDACIONES GENERALES

Dado que el laboratorio es un lugar donde se manipulan gran cantidad y variedad de productos peligrosos, con el fin de evitar su contacto o ingestión siendo fuente de intoxicaciones o accidentes, se pueden establecer una serie de normas de tipo general sobre diferentes aspectos aplicables a la mayoría de los laboratorios.

8.2.1 Organización

- La organización y distribución física del laboratorio (distribución de superficies, instalación de aparatos, procedimientos de trabajo, instalaciones generales, etc.) debe ser estudiada a fondo y procurar que sea adecuada para el mantenimiento de un buen nivel preventivo.
- El laboratorio debe disponer de los equipos de protección individual (EPIs) y de las instalaciones de emergencia o elementos de actuación (duchas, lavaojos, mantas ignífugas, extintores, etc.) adecuados a los riesgos existentes.
- El laboratorio debe mantenerse ordenado y en elevado estado de limpieza. Deben recogerse inmediatamente todos los vertidos que ocurran, por pequeños que sean.
- No deben realizarse experiencias nuevas sin autorización expresa del responsable del laboratorio ni poner en marcha nuevos aparatos e instalaciones sin conocer previamente su funcionamiento, características y requerimientos, tanto generales como de seguridad.

8.2.2 Normas generales de conducta

- Como norma higiénica básica, el personal debe lavarse las manos al entrar y salir del laboratorio y siempre que haya habido contacto con algún producto químico. Debe llevar en todo momento las batas y ropa de trabajo abrochadas y los cabellos recogidos, evitando colgantes o mangas anchas que pudieran engancharse en los montajes y material del

laboratorio. No se debe trabajar separado de la mesa o la poyata, en la que nunca han de depositarse objetos personales.

- El personal de nueva incorporación debe ser inmediatamente informado sobre las normas de trabajo, plan de seguridad y emergencia del laboratorio, y características específicas de peligrosidad de los productos.
- No debe estar autorizado el trabajo en solitario en el laboratorio, especialmente cuando se efectúe fuera de horas habituales, por la noche, o si se trata de operaciones con riesgo. Cuando se realicen éstas, las personas que no intervengan en las mismas, pero puedan verse afectadas, deben estar informadas de las mismas.
- Está prohibido fumar e ingerir alimentos en el laboratorio. Nunca se emplearán recipientes de laboratorio para contener bebidas o alimentos ni se colocarán productos químicos en recipientes de productos alimenticios.
- Se debe evitar llevar lentes de contacto si se detecta una constante irritación de los ojos y sobre todo si no se emplean gafas de seguridad de manera obligatoria. Es preferible el uso de gafas de seguridad graduadas.

8.2.3 Utilización de productos y materiales

- Antes de procederse a su utilización deben comprobarse siempre que los productos y materiales presenten garantías de hallarse en buen estado.
- Debe comprobarse el correcto etiquetado de los productos químicos que se reciben en el laboratorio, etiquetar adecuadamente las soluciones preparadas y no reutilizar los envases sin retirar la etiqueta original.
- Los productos químicos deben manipularse cuidadosamente, no llevándolos en los bolsillos, ni tocándolos o probándolos y no pipeteando con la boca, guardando en el laboratorio la mínima cantidad imprescindible para el trabajo diario.
- No deben emplearse frigoríficos de tipo doméstico para el almacenamiento de productos químicos ni guardar alimentos ni bebidas en los frigoríficos destinados a productos químicos.
- Los tubos de ensayo no deben llenarse más de 2 ó 3 cm, han de tomarse con los dedos, nunca con la mano, siempre deben calentarse de lado utilizando pinzas, no deben llevarse en los bolsillos y deben emplearse

gradillas para guardarlos. Para sujetar el material de laboratorio que lo requiera deben emplearse soportes adecuados.

- Reducir al máximo la utilización de llamas vivas en el laboratorio. Para el encendido de los mecheros Bunsen emplear preferentemente encendedores piezoeléctricos.
- Al finalizar la tarea o una operación recoger los materiales, reactivos, etc. para evitar su acumulación fuera de los lugares específicos para guardarlos y asegurarse de la desconexión de los aparatos, agua corriente, gases, etc.

8.2.4 Equipos: uso, mantenimiento y revisiones

- Deben revisarse periódicamente las instalaciones del laboratorio para comprobar que se hallan en buen estado. Deben evitarse, en la medida de lo posible, las conexiones múltiples y las alargaderas, tanto en la instalación eléctrica como en la de gases.
- Debe comprobarse la ventilación general del laboratorio: trabajo en depresión, velocidad de circulación del aire de las zonas con menor contaminación a las de mayor contaminación ambiental, renovación suficiente y adecuadas condiciones termohigrométricas.
- Debe trabajarse, siempre que sea posible y operativo, en las vitrinas. En éstas debe comprobarse periódicamente el funcionamiento del ventilador, el cumplimiento de los caudales mínimos de aspiración, su estado general y que no se conviertan en un almacén improvisado de productos químicos.

8.2.5 Almacenamiento de productos

El almacenamiento prolongado de los productos químicos representa en sí mismo un peligro, ya que dada la propia reactividad intrínseca de los productos químicos pueden ocurrir distintas transformaciones:

- Formación de peróxidos inestables con el consiguiente peligro de explosión al destilar la sustancia o por contacto.
- Polimerización de la sustancia que, aunque se trata en principio de una reacción lenta, puede en ciertos casos llegar a ser rápida y explosiva.

- El recipiente que contiene el producto puede atacarse y romperse por sí sólo.
- Descomposición lenta de la sustancia produciendo un gas cuya acumulación puede hacer estallar el recipiente.

Son normas generales para la reducción del riesgo en el almacenamiento de los productos químicos:

- Mantener el stock al mínimo operativo, lo que redonda en aumento de la seguridad y reducción de costes, y disponer de un lugar específico (almacén, preferiblemente externo al laboratorio) convenientemente señalizado, guardando en el laboratorio solamente los productos imprescindibles de uso diario.
- Considerar las características de peligrosidad de los productos y sus incompatibilidades, agrupando los de características similares, separando los incompatibles y aislando o confinando los de características especiales: muy tóxicos, cancerígenos, explosivos, etc.
- Comprobar que todos los productos están adecuadamente etiquetados, llevando un registro actualizado de productos almacenados. Se debe indicar la fecha de recepción o preparación, nombre del técnico responsable y de la última manipulación.
- Emplear armarios de seguridad de RF-15 como mínimo, lo que reduce el riesgo del almacenamiento en el propio laboratorio y permite técnicamente (ICT-MIE-APQ-001) guardar mayores cantidades de productos inflamables. Emplear armarios específicos para corrosivos, especialmente si existe la posibilidad de la generación de vapores.
- Emplear frigoríficos antideflagrantes o de seguridad aumentada para guardar productos inflamables muy volátiles.

8.2.6 Eliminación de residuos

La gestión de los residuos del laboratorio tiene una problemática diferenciada de los industriales ya que, en general, se generan en pequeñas cantidades, presentan gran variedad y elevada peligrosidad tanto desde el punto de vista fisicoquímico, como toxicológico y para el medio ambiente. Su no tratamiento y acumulación en el laboratorio, genera la presencia de productos químicos peligrosos innecesarios. Además, a menudo, no suelen estar adecuadamente envasados, identificados y almacenados.

Su gestión debe basarse en los principios de minimización, reutilización, tratamiento y eliminación segura. Para ello se deberá establecer un programa de gestión de residuos en el laboratorio que contemple todos los residuos generados, sean banales (no especiales o no peligrosos) o peligrosos (especiales). El programa debe contemplar básicamente los siguientes aspectos:

- Inventario de todos los productos considerados como residuos.
- Definición de grupos en base a sus características fisicoquímicas, incompatibilidades, riesgos específicos y/o tratamiento y eliminación posterior.
- Contemplar las posibilidades de minimización considerando la posible reutilización, recuperación, neutralización y eliminación. Una adecuada gestión de compras, manteniendo el stock al mínimo, reduce el volumen de los residuos al disminuir la cantidad generada por reactivos caducados, sobrantes o de uso no previsible.
- Implantación de un sistema de recogida selectiva en función de los grupos establecidos con provisión de contenedores adecuados a las características de los residuos e identificación y etiquetado de los envases y contenedores.
- Información y formación del personal del laboratorio sobre la existencia y características del plan de gestión de residuos.

8.3 ACTUACIÓN EN CASOS DE EMERGENCIA

Además de los aspectos generales del plan de emergencia, deben contemplarse una serie de situaciones específicas en los laboratorios, para las cuales debe disponerse de un plan concreto de actuación.

8.3.1 Actuación en caso de: Vertidos

En caso de vertidos o derrames debe actuarse rápidamente, recogiendo inmediatamente el producto derramado evitando su evaporación y daños sobre las instalaciones. El procedimiento a emplear está en función de las características del producto: inflamable, ácido, álcali, mercurio, etc., existiendo actualmente absorbentes y neutralizadores comercializados.

8.3.2 Actuación en caso de: Atmósfera contaminada

La atmósfera de un laboratorio puede ser tóxica o explosiva después de un accidente/incidente: rotura de un frasco, vertido de un reactivo, fuga de un gas, etc.

Las acciones a llevar a cabo para el control del riesgo son las siguientes:

- Si la contaminación es débil:
 - Abrir todas las ventanas.
 - Poner en marcha la vitrina con la pantalla totalmente abierta.

- Si la contaminación es importante:
 - Activar el sistema de emergencia.
 - Evacuar el personal del local.
 - Avisar al equipo de intervención provisto del material de protección adecuado al riesgo: equipos de protección respiratoria, vestidos de protección, guantes, etc.
 - Cerrar todos los aparatos con llama si el producto contaminante es volátil e inflamable.
 - Abrir las ventanas.
 - Poner en marcha las vitrinas.
 - Si ha tenido su origen en un vertido, absorberlo con el absorbente indicado para dicho vertido y guardarlo en un recipiente estanco, lavando y aclarando con agua corriente, siempre empleando guantes. Si no se dispone del absorbente adecuado, emplear papel adsorbente.
 - Prohibir la entrada al local hasta que la concentración ambiental de la sustancia peligrosa en la atmósfera deje de ser un riesgo.

8.3.3 Actuación en caso de: Incendio

Una parte importante de las instrucciones generales de seguridad en el laboratorio están destinadas a la prevención y protección contra incendios. El conjunto de una adecuada prevención y una rápida detección y actuación son las armas más eficaces para la reducción del riesgo de incendio.

El riesgo de incendio estará previsto en el plan de emergencia. Si es alto y/o la ocupación del laboratorio elevada, debe disponer de dos salidas con puertas que se abran hacia el exterior. Cuando concluya la evacuación del laboratorio, deben cerrarse las puertas.

El laboratorio debe estar dotado de extintores portátiles (agua pulverizada, halogenados, CO₂, polvo) adecuados a los tipos de fuegos posibles, debiendo el personal del laboratorio conocer su funcionamiento a base de entrenamiento. Los extintores deben estar colocados a una distancia de los puestos de trabajo que los hagan rápidamente accesibles.

Son especialmente útiles para el control de pequeños incendios en el laboratorio las mantas ignífugas. Si el fuego prende la ropa, utilizar también la

manta o la ducha de seguridad, procurando que el desplazamiento sea mínimo.

Al entrar por primera vez en un laboratorio habrá que conocer qué medios contra incendios y emergencias existen y en donde se encuentran.

8.3.4 Actuación en caso de: Quemadura térmica

Durante las operaciones que tienen lugar en el laboratorio pueden darse quemaduras de origen térmico por contacto con llamas, superficies y líquidos calientes y otras fuentes de altas temperaturas.

En caso de que se produzca una quemadura de este tipo se procederá de la siguiente manera:

- Lavar la zona afectada con abundante agua para enfriarla.
- No quitar la ropa que se encuentra pegada a la piel.
- No romper las ampollas.
- Tapar la parte quemada con ropa limpia.
- No aplicar ninguna pomada, grasa o desinfectante en la zona afectada por la quemadura.
- No suministrar bebidas ni alimentos.
- Permanecer como mínimo una persona junto al accidentado.
- Acudir siempre al médico, independientemente del grado de la quemadura.

8.4 PREVENCIÓN EN EL LABORATORIO: MATERIAL Y EQUIPOS

8.4.1 Introducción

En el laboratorio, además de los riesgos intrínsecos de los productos químicos y de los generados por las operaciones que con ellos se realizan, deben considerarse también los que tienen su origen en las instalaciones, material de laboratorio y equipos existentes en el mismo.

El laboratorio dispone normalmente de una serie de instalaciones o servicios generales de gas, agua, aire comprimido, vacío, electricidad, etc. de los cuales el responsable del laboratorio debe tener constancia que cumplen las normativas de carácter estatal, autonómico o local que les afecten, que se hallen en buen estado y estén sometidas a un mantenimiento adecuado que garantice tanto el cumplimiento de la reglamentación comentada, como un riesgo nulo o escaso de provocar daños al personal que las utiliza en su trabajo en el laboratorio.

8.4.2 Ventilación

El laboratorio debe estar dotado de un sistema de ventilación general que permita su acondicionamiento ambiental en cuanto a necesidades termohigrométricas y la dilución y evacuación de contaminantes. El adecuado acondicionamiento ambiental del laboratorio se consigue actuando sobre la temperatura, el índice de ventilación y la humedad del aire. El sistema de ventilación debe comprobarse periódicamente especialmente, el funcionamiento del ventilador o campana extractora, el cumplimiento de los caudales mínimos de aspiración, su estado general y que no se conviertan en un almacén improvisado de productos químicos.

El control ambiental del laboratorio exige dos actuaciones bien diferenciadas: la retirada de contaminantes y la renovación del aire. Aunque la simple renovación del aire del ambiente permite hasta un cierto punto controlar el nivel de contaminación ambiental (disminución de olores y dilución de la concentración de contaminantes) es incapaz de eliminar eficazmente los contaminantes generados en el laboratorio por lo que es necesaria la existencia de una campana extractora para facilitar la extracción localizada.

Debe trabajarse, siempre que sea posible y operativo, en las vitrinas, sobre todo cuando se manipulen productos peligrosos.

Los riesgos ocasionados por una mala ventilación en un laboratorio pueden producir:

- Efectos negativos sobre la salud de los ocupantes.
- Molestias o disminución de la sensación de confort.
- Daños a los elementos constructivos y decorativos.

La prevención adecuada frente a estos riesgos es:

- Ventilación del laboratorio eficaz, independiente del resto de las dependencias.
- Mantenimiento del laboratorio en depresión respecto a las zonas colindantes.
- Circulación del aire del lugar menos contaminado al más contaminado.
- Extracción localizada mediante vitrinas de laboratorio.
- Ventilación de emergencia.

8.4.3 Material de vidrio

Es un elemento fundamental en el trabajo de laboratorio debido su transparencia, manejabilidad, facilidad de diseño y sencillez en la preparación

de montajes, permitiendo, además, su moldeabilidad por calentamiento y la fabricación de piezas a medida.

Los riesgos asociados a la utilización del material de vidrio son:

- Cortes producidos por rotura del material de vidrio debido a su fragilidad mecánica, térmica, cambios bruscos de temperatura o presión interna.
- Cortes o heridas como consecuencia del proceso de apertura de ampollas selladas, frascos con tapón esmerilado, llaves de paso, conectores etc.,
- Explosión, implosión e incendio por rotura del material de vidrio en operaciones realizadas a presión o al vacío.

Las medidas de prevención adecuadas frente a estos riesgos son:

- Examinar el estado de las piezas antes de utilizarlas y desechar las que presenten el más mínimo defecto o haya sufrido un golpe de cierta consistencia.
- Efectuar los montajes para las diferentes operaciones (reflujos, destilaciones ambientales y al vacío, reacciones con adición y agitación, endo y exotérmicas, etc.) con cuidado, evitando que queden tensionados, empleando soportes y abrazaderas adecuados y fijando todas las piezas.

8.4.4 Instalación eléctrica; Aparatos eléctricos

La instalación eléctrica del laboratorio debe estar diseñada en el proyecto de obra de acuerdo con el Reglamento Electrotécnico de Baja Tensión (REBT) y en función de sus líneas de trabajo, del tipo de instrumental utilizado y teniendo en cuenta las futuras necesidades del laboratorio. Este aspecto debe ser contemplado en todas las modificaciones que se realicen. Por otro lado, la incorporación de nuevo instrumental debe tener en cuenta sus requerimientos eléctricos.

Los conductores deben estar protegidos a lo largo de su recorrido y su sección debe ser suficiente para evitar caídas de tensión y calentamientos. Las tomas de corriente para usos generales deben estar en número suficiente y convenientemente distribuidas con el fin de evitar instalaciones provisionales.

En los locales o zonas donde se trabaje con líquidos inflamables la instalación eléctrica ha de ser de seguridad aumentada o antideflagrante y debe cumplir las normas específicas del REBT MIE-BT026 sobre Prescripciones Particulares para las Instalaciones de Locales con Riesgo de Incendio y Explosión.

De entre los distintos aparatos que tienen conexión eléctrica, es recomendable disponer de líneas específicas para los equipos de alto consumo.

Los riesgos asociados a la utilización de instrumental eléctrico son:

- Electrocutión por contacto directo o indirecto, generado por todo aparato que tenga conexión eléctrica.
- Inflamación o explosión de vapores inflamables por chispas o calentamiento del aparato eléctrico.

Los consejos para la prevención de estos riesgos son:

- Disponer de un cuadro general, preferiblemente en cada unidad de laboratorio, con diferenciales y automáticos.
- Disponer de interruptor diferencial adecuado, toma de tierra eficaz e interruptor automático de tensión (magnetotérmico).
- Distribución con protección (automático omnipolar) en cabeza de derivación.
- Instalar la fuerza y la iluminación por separado, con interruptores.
- Emplear instalaciones entubadas, siendo las > 750 V, rígidas.
- Aplicación del código de colores y grosores.
- No emplear de modo permanente alargaderas y multiconectores (ladrones).
- Mantener las distancias al suelo según las características del local.
- Usar circuitos específicos para aparatos especiales.
- En áreas especiales (húmedas y laboratorios de prácticas) emplear bajo voltaje (24 V), estancos, tapas, etc. Emplear seguridad aumentada para el trabajo de manera permanente con inflamables.
- Mantenimiento adecuado e inspecciones y comprobaciones periódicas.

8.4.5 Aparatos con llama

El trabajo con llama abierta genera riesgos de incendio y explosión por la presencia de gases combustibles, o de productos inflamables en el ambiente próximo donde se utilizan.

Para la prevención de estos riesgos son acciones adecuadas:

- Suprimir la llama o la sustancia inflamable, aislándolas, o garantizar una ventilación suficiente para que no se alcance jamás el límite inferior de inflamabilidad.

- Calentar los líquidos inflamables mediante sistemas que trabajen a una temperatura inferior a la de autoignición (p.e., baño maría).
- Utilizar equipos con dispositivo de seguridad que permita interrumpir el suministro de gases en caso de anomalía.
- Mantenimiento adecuado de la instalación de gas.

8.4.6 Baños calientes y dispositivos de calefacción

Los principales riesgos que presentan son quemaduras térmicas, rotura de recipientes de vidrio ordinario con desprendimiento de vapores, vuelcos, vertidos, emisión incontrolada de humos en los baños de aceite y generación de calor y humedad ambiental en los baños de agua.

También es importante el riesgo de contacto eléctrico indirecto por envejecimiento del material.

Para prevenir estos riesgos las principales acciones a tomar son:

- No llenar completamente el baño hasta el borde.
- Asegurar su estabilidad con ayuda de soportes.
- No introducir recipientes de vidrio ordinario en el baño, utilizar vidrio tipo Pyrex.
- Disponer de un termostato de seguridad para limitar la temperatura.
- Utilizar dispositivos aislantes térmicos que no contengan amianto.
- Cuando su uso sea continuado, disponer de extracción localizada.
- Llevar a cabo un mantenimiento preventivo con revisiones periódicas, que deben aumentar de frecuencia con el uso y la antigüedad del dispositivo.

8.4.7 Baños fríos

Normalmente, los contactos puntuales y poco intensos con el líquido refrigerante no producen daños ya que la evaporación es instantánea, pero un contacto prolongado es peligroso. Los principales riesgos que presentan son: quemaduras por frío y desprendimiento de vapores. También hay que tener en cuenta que si se emplean para el control de reacciones exotérmicas, cualquier incidente que anule su función puede generar un incendio, una explosión o la emisión de sustancias tóxicas al ambiente.

Normas generales para la prevención de estos riesgos:

- No introducir las manos sin guantes protectores en el baño frío.
- Manipular la nieve carbónica con la ayuda de pinzas y guantes térmicos.
- Introducir los recipientes en el baño frío lentamente con el fin de evitar una ebullición brusca del líquido refrigerante.
- Emplear los baños de acetona con nieve carbónica en la vitrina.

8.4.8 Estufas

Presentan riesgos de explosión, incendio e intoxicación si se desprenden vapores inflamables en la estufa, de sobrecalentamiento si se produce un fallo en el termostato y de contacto eléctrico indirecto.

El control del riesgo en la utilización de las estufas se basa en las siguientes recomendaciones:

- Si se utiliza una estufa para evaporar líquidos volátiles debe disponerse de un sistema de extracción y retención por filtrado o por condensación de los vapores producidos. Si los vapores que se desprenden son inflamables, es recomendable emplear estufas de seguridad aumentada o con instalación antideflagrante.
- Emplear estufas con sistemas de seguridad de control de temperaturas (doble termostato, por ejemplo).
- Efectuar un mantenimiento adecuado, comprobando además la ausencia de corrientes de fuga por envejecimiento del material y correcto estado de la toma de tierra.

8.4.9 Botellas e instalación de gases

En el laboratorio se suelen utilizar gases a presión suministrados a través de una instalación fija o directamente de las bombonas. En ambos casos hay que observar determinadas precauciones y disponer de un protocolo de utilización. Las posibles situaciones de fugas e incendios deben estar contempladas en el plan de emergencia del laboratorio. La utilización de botellas, aun disponiendo de instalación de gases fija, es relativamente corriente.

Las situaciones de riesgo características en el empleo de gases a presión, disueltos o licuados:

- Caída de la botella.
- Intoxicación en caso de fuga de un gas tóxico, irritante o corrosivo de una botella o de la instalación.
- Fuga de un gas explosivo.
- Fuga de un gas inerte.
- Incendio en la boca de una botella de un gas inflamable.
- Sobreesfuerzos en el traslado de las botellas.

Control del riesgo:

- Mantener las botellas fijas sujetándolas a un soporte sólido.
- Disponer de un plan de actuación para casos de fugas e incendio en la boca de la botella.

- Observar las precauciones adecuadas a las características del gas manipulado.
- Disponer de carro adecuado para trasladar las botellas de gases.

8.4.10 Centrífugas

Riesgos:

- Rotura del rotor.
- Heridas en caso de contacto con la parte giratoria.
- Explosión por una atmósfera inflamable.
- Formación de bioaerosoles.

Control del riesgo:

- Repartir la carga simétricamente.
- La centrífuga debe llevar un mecanismo de seguridad de tal manera que no pueda ponerse en marcha si la tapa no está bien cerrada e impidiendo su apertura sí el rotor está en movimiento.
- Disponer de un procedimiento de actuación para el caso de roturas.

8.4.11 Pipetas y buretas

Riesgos:

- Contacto o ingestión de un líquido tóxico o corrosivo.
- Cortes por rotura.

Control del riesgo:

- Prohibir pipetear con la boca.
- Utilizar siempre guantes impermeables al producto manipulado.
- Utilizar bombas de aspiración manual de caucho o cremallera que se adapten bien a las pipetas a utilizar.
- Para algunas aplicaciones y reactivos es recomendable utilizar un dispensador automático de manera permanente.

8.4.12 Instrumental analítico

Aplicable al espectrofotómetro UV-visible e infrarrojo, fluorímetro, balanza, pHmetro, polarógrafo y otros aparatos de electroanálisis, autoanalizadores, microscopios, agitadores, etc.

Los riesgos asociables a esta instrumentación son básicamente de contacto eléctrico, quemadura térmica si hay zonas calientes, formación de ozono cuando se utilizan lámparas o radiaciones a determinadas longitudes de onda, etc.

Los procedimientos para reducir los riesgos existentes en la instrumentación se basan de una manera general en:

- Instalación adecuada.
- Mantenimiento preventivo eficaz.
- Instrucciones de uso y procedimientos normalizados de trabajo con las adecuadas instrucciones de seguridad que contemplen la especificidad de cada técnica. Por ejemplo: en el caso de la electroforesis a alto voltaje debe prestarse especial atención al riesgo eléctrico.

8.5 PREVENCIÓN EN EL LABORATORIO: OPERACIONES BÁSICAS

8.5.1 Introducción

Cualquier operación del laboratorio en la que se manipulen productos químicos presenta siempre unos riesgos. Para eliminarlos o reducirlos de manera importante es conveniente, antes de efectuar cualquier operación, hacer una lectura crítica del procedimiento a seguir, asegurarse de disponer del material adecuado, manipular siempre la cantidad mínima de producto químico, llevar las prendas y accesorios de protección adecuados y tener previsto un plan de actuación en caso de incidente. A continuación se revisan una serie de operaciones habituales en el laboratorio, relacionando los posibles riesgos y las correspondientes actuaciones para su reducción.

8.5.2 Trasvases de líquidos

Los trasvases se pueden realizar por vertido libre, con sifón o con la ayuda de una bomba. En el primer caso puede haber riesgos de vertido de líquidos e intoxicación por vapores. Para la prevención de estos *riesgos* es aconsejable:

- Emplear una bomba o un sifón para trasvases de gran volumen.
- Utilizar gafas o pantallas de protección facial cuando se trasvasen productos irritantes o corrosivos. Para trasvasar ácidos y bases se recomiendan los guantes de PVC (cloruro de polivinilo).
- Suprimir las fuentes de calor, llamas y chispas en la proximidad de un puesto donde se realicen trasvases de líquidos inflamables. Si la cantidad de producto a trasvasar es importante, debe realizarse la operación en un lugar específico acondicionado especialmente y con ventilación suficiente.

Cuando la operación de trasvase es mediante sifón o bombeo puede haber riesgo de explosión por sobrepresión. Para evitar este riesgo, la alternativa es, evidentemente, la utilización del vaciado por gravedad. Si se emplea una bomba puede equiparse con dispositivos de seguridad para evitarlo. También en este caso deberá comprobarse siempre la adecuación de la bomba al producto a trasvasar: Compatibilidad de materiales, corrosión, contaminación, riesgo de explosión, etc.

Al trasvasar cantidades importantes de líquidos no conductores debe valorarse siempre el problema de la electricidad estática.

8.5.3 Operaciones con vacío

Entre las diferentes operaciones en que se puede utilizar el vacío destacan la evaporación, la destilación, la filtración y el secado. Estas operaciones presentan riesgos de implosión del aparato y proyección de material, aspiración de un líquido y mezcla imprevista de productos que reaccionen violentamente. Es recomendable para el control de riesgos:

- Utilizar recipientes de vidrio especiales capaces de soportar el vacío (paredes gruesas o formas esféricas) e instalar el aparato en un lugar donde no haya riesgo de que sufra un choque mecánico.
- Recubrir con cinta adhesiva o red metálica el recipiente en depresión.
- El paso de vacío a presión atmosférica debe ser gradual y lento.

8.5.4 Mezcla de productos o adición de un producto

Puede tener lugar una reacción imprevista acompañada de un fenómeno peligroso (explosión, proyección).

Para el control de este riesgo es recomendable disponer de un protocolo de actuación y de información sobre la identidad y peligrosidad de los productos que se manipulan. Por otro lado, cuando se trata de la adición de un reactivo, la velocidad debe de ser proporcionada a la reacción producida. Debe ser especialmente lenta si la reacción es exotérmica, provoca espuma, ocurre o puede ocurrir una polimerización rápida, etc.

8.5.5 Extracción con disolventes volátiles

8.5.5.1 Extracción en caliente

La extracción líquido-sólido o líquido-líquido en caliente es una operación relativamente rutinaria en los laboratorios de química, dado que para ella se suelen emplear líquidos volátiles inflamables, cualquier sobrepresión en el montaje o una fuga de vapor puede provocar un incendio. Téngase en cuenta

que siempre que se manipulen sustancias de estas características se presenta riesgo de incendio y explosión.

Los sistemas para el control de estos riesgos son:

- Calentar el sistema de extracción empleando un baño maría o en un baño de aceite a una temperatura suficiente, pero no más alta, para asegurar la ebullición del disolvente.
- Realizar la operación en vitrina.
- Disponer de un sistema de actuación (extintor manual adecuado, manta ignífuga, etc.) próximo al lugar de la operación.
- Cuando la extracción sea de larga duración es recomendable disponer de un sistema de control del agua de refrigeración frente a posibles cortes.

8.5.5.2 Extracción líquido-líquido

En la mayor parte de los procesos de extracción líquido-líquido a temperatura ambiente, una de las fases es un compuesto orgánico volátil, normalmente un disolvente inflamable, por lo que habrá que aplicarle las recomendaciones generales frente a la utilización de este tipo de compuestos que ya se han citado (sobrepresión, presencia de vapores inflamables).

Si se emplea un embudo de decantación con agitación manual, existe además el problema del contacto directo con los productos y la posibilidad de proyecciones de líquidos e inhalación de concentraciones elevadas de vapores al aliviar la presión del embudo (generada por la vaporización durante la agitación) a través de la válvula de la llave de paso. En esta operación es recomendable usar guantes impermeables, ropa de protección y, si las sustancias que intervienen en el proceso tienen características de peligrosidad elevadas, realizar la operación en vitrina, aunque ello represente incomodidad.

8.5.5.3 Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido (procedimiento mediante el cual se retiene el producto a extraer de un líquido en un sólido adsorbente o impregnado por un absorbente) presenta un uso cada vez más extendido. El procedimiento, por sus propias características (poca cantidad de muestra y, en consecuencia, de productos a manipular, posibilidad de automatización, etc.) presenta pocos problemas. Los riesgos más característicos son los derivados de la utilización de presión y vacío en los sistemas semiautomatizados y de manipulación inadecuada en caso de obstrucción del cartucho o del disco de extracción.

8.5.6 Evaporación y/o secado

Las operaciones de evaporación y secado, cuando se trata de disolventes, presentan el riesgo de desprendimiento de vapores tóxicos o inflamables. Para su prevención son acciones adecuadas:

- Efectuar la operación en el interior de una vitrina o emplear un evaporador rotatorio.
- Si el aporte de calor mediante estufa es indispensable se utilizará una que esté ventilada, disponga de un sistema de aspiración de vapores y se trabajará siempre a temperaturas moderadas, asegurándose que en ningún punto del interior o exterior de la estufa se puede sobrepasar el punto de autoinflamación.
- La evaporación de un producto empapado de un líquido volátil se puede efectuar en frío.

8.6 PREVENCIÓN EN EL LABORATORIO: REACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS

8.6.1 Introducción

Al trabajar con productos químicos, es primordial prever las posibles reacciones entre ellos con el fin de evitar posibles reacciones químicas peligrosas, no sólo la formación de compuestos intermedios o finales que su exposición entrañe un riesgo para la salud, como gases desprendidos en el transcurso de una reacción, sino la posibilidad de explosiones o salpicaduras. Habrá que tener muy en cuenta las posibles incompatibilidades entre los productos químicos y el grado de exotermicidad en sus reacciones.

En este sentido, se relacionan una serie de características de peligrosidad de los productos químicos y se comentan desde el punto de vista de su manipulación y almacenamiento. La reactividad se contempla desde las siguientes perspectivas:

- Compuestos que reaccionan violentamente con el agua
- Compuestos que reaccionan violentamente con el aire
- Incompatibilidad
- Reacciones peligrosas con los ácidos
- Formación de peróxidos
- Reacciones de polimerización
- Reacciones de descomposición.

8.7 CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO DE SUSTANCIAS PELIGROSAS

8.7.1 Introducción

Para los productos químicos la información sobre su peligrosidad y el riesgo derivado de su utilización está recogida en la etiqueta y ampliada en la ficha de datos de seguridad (FDS). Su contenido está regulado por la legislación sobre comercialización de productos químicos relativa a la clasificación, envasado y etiquetado de sustancias y preparados peligrosos recogida en los Reales Decretos 363/1995 y 255/2003, que obliga a que todo producto químico esté debidamente etiquetado tanto si va destinado al público en general como al usuario profesional, en cuyo caso deberá también disponer de la FDS.

La obligación de identificar los productos químicos no es exclusiva de los productos comercializados sino que incluye cualquier producto presente en el lugar de trabajo, por lo que no es aceptable la presencia de productos sin etiquetar o identificar provenientes de un trasvase, generados en el proceso o como residuos (RD 485/1997).

8.7.2 Peligrosidad de las sustancias químicas

8.7.2.1 Categorías de peligro

Las sustancias se consideran peligrosas si presentan alguna de las características de peligro establecidas de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas (efectos sobre la salud) y eco-toxicológicas (efectos sobre el medio ambiente).

8.7.2.2 Etiquetado

Todo producto químico, sustancia o preparado, clasificado como peligroso debe incluir en su envase una etiqueta bien visible que es la primera información básica que recibe el usuario sobre los peligros inherentes al mismo y sobre las precauciones a tomar en su manipulación. Esta etiqueta, redactada en el idioma oficial del Estado, contendrá:

- Nombre de la sustancia.
- Nombre, dirección y teléfono del fabricante o importador. Es decir del responsable de su comercialización en la Unión Europea (UE).
- Símbolos e indicaciones de peligro normalizadas para destacar los riesgos principales.
- Frases R que permiten identificar y complementar determinados riesgos mediante su descripción.

- Frases S que, a través de consejos de prudencia, establecen medidas preventivas para la manipulación y utilización.
- Número de registro CE de la sustancia (número EINECS o ELINCS).

El etiquetado de un producto implica la asignación de unas categorías de peligro definidas y preestablecidas basadas en las propiedades fisicoquímicas, en las toxicológicas, en los efectos específicos sobre la salud humana y en los efectos sobre el medio ambiente, identificadas mediante pictogramas y símbolos de peligrosidad (E, O, F+, F, T+, T, Xn, Xi, C, N).

Las definiciones, las distintas categorías de peligros, los pictogramas y las frases de riesgo más características se recogen en los cuadros del [Anexo II](#).

8.7.2.3 Ficha Internacional de Seguridad Química (FIDQ)

La FIDQ es una importante fuente de información complementaria de la contenida en la etiqueta y constituye una herramienta de trabajo imprescindible en el campo de la prevención de riesgos laborales y de la protección al medio ambiente ya que suministra información para tomar las medidas necesarias para la protección de la salud y de la seguridad en el lugar de trabajo. El responsable de la comercialización debe suministrarla obligatoriamente a los usuarios profesionales proporcionando información sobre las propiedades de la sustancia y los peligros para la salud y el medio ambiente, así como sobre los riesgos derivados de sus propiedades físicas y químicas, controles de exposición, manipulación, almacenamiento y eliminación. Estas fichas también informan sobre las medidas de lucha contra incendios, los medios de protección, precauciones a tomar en caso de vertido accidental y primeros auxilios.

La FDS se suministrará de forma gratuita y nunca más tarde de la primera entrega del producto y posteriormente siempre que se produzcan revisiones por nuevos conocimientos significativos relativos a la seguridad y a la protección de la salud y del medio ambiente.

- 1) Identificación del preparado y del responsable de su comercialización.
- 2) Composición/información sobre los componentes.
- 3) Identificación de los peligros
- 4) Primeros auxilios.
- 5) Medidas de lucha contra incendios.
- 6) Medidas en caso de caso de vertido accidental.
- 7) Manipulación y almacenamiento.
- 8) Controles de la exposición/protección personal.
- 9) Propiedades físicas y químicas.
- 10) Estabilidad y reactividad.

- 11) Información toxicológica.
- 12) Información ecológica.
- 13) Consideraciones relativas a la eliminación.
- 14) Información relativa al transporte.
- 15) Información reglamentaria.
- 16) Otra información.

8.8 ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS

Desde el punto de vista de seguridad la principal medida es el mantenimiento de los “stocks” de productos químicos peligrosos al nivel más bajo posible y en la utilización de locales separados.

Un aspecto muy importante en el almacenamiento de los productos químicos es el de la incompatibilidad. En consecuencia, los productos que puedan reaccionar entre sí de forma violenta, no deben almacenarse conjuntamente a partir de ciertas cantidades. En caso de incendio, caídas, roturas o cualquier tipo de incidente, los envases o embalajes pueden resultar dañados y los productos contenidos en ellos pueden entrar en contacto produciendo reacciones peligrosas. Los productos tóxicos no deben almacenarse junto a productos comburentes y ambos no deben almacenarse junto a inflamables, peróxidos, gases comprimidos, licuados o disueltos y productos que desprendan gases inflamables en contacto con el agua. En la siguiente **Figura 8.1** se resumen las incompatibilidades más características.

						
	+	-	-	-	-	+
	-	+	-	-	-	-
	-	-	+	-	-	+
	-	-	-	+	-	-
	-	-	-	-	+	o
	+	-	+	-	o	+

Figura 8.1 Resumen incompatibilidades de almacenamiento de sustancias peligrosas. (+) Se pueden almacenar juntas, (o) solamente podrán almacenarse juntas bajo medidas específicas de prevención, (-) no almacenables juntas.

8.8.1 Características de peligrosidad a considerar en los almacenamientos

Además de las características intrínsecas de la peligrosidad de los productos químicos ya descritas (explosividad, inflamabilidad, toxicidad, corrosividad, etc.), debe considerarse también otros factores:

- Las estanterías deberán estar fijadas o sujetas a la pared para evitar su caída.
- No se deberá emplear ningún equipo eléctrico.
- La instalación de iluminación deberá ser estanca.
- Dispondrá de sistema de ventilación forzada.

8.9 EXTRACCIÓN LOCALIZADA EN EL LABORATORIO

Un sistema de extracción localizada tiene como objetivo captar el contaminante en el lugar más próximo posible del punto donde se ha generado, el foco contaminante, evitando que se difunda al ambiente general del laboratorio.

El correcto funcionamiento de vitrinas de laboratorio es prioritario en la prevención de la exposición a agentes químicos en laboratorios, debiendo estar totalmente prohibido trabajar con sustancias muy tóxicas fuera de ellas o en aquellas que no alcancen el caudal mínimo exigido.

La cabina debe situarse en zonas de poco tránsito y alejada de puertas, ventanas o rejillas de suministro de aire al laboratorio. Los ventiladores deben estar situados fuera del edificio, y se deben prever los filtros necesarios para depurar el aire extraído según la naturaleza de los productos manipulados y las reglamentaciones sobre contaminación ambiental.

8.9.1 Normas para la utilización de la vitrina de gases

Antes de utilizar una vitrina hay que hacer una valoración del riesgo de las operaciones que se van a realizar y comprobar si la vitrina es adecuada en cuanto a diseño, materiales de construcción, servicios (como electricidad, agua, etc.), situación y ubicación en el laboratorio y sistema de ventilación. Concretamente se deben contemplar los siguientes aspectos:

8.9.1.1 Extracción de caudal de aire

- Comprobar que el sistema de extracción funciona correctamente (nunca operar sin la extracción en marcha).
- Comprobar que el indicador de flujo de la vitrina, si existe, funciona correctamente y no presenta situación de alarma.

- Comprobar que no haya puertas o ventanas abiertas, principalmente en el entorno que puedan distorsionar el correcto funcionamiento de la vitrina.

8.9.1.2 Organización del trabajo

- No se debe utilizar la vitrina de gases como unidad de almacenamiento.
- Disponer en el interior de la vitrina el material indispensable para llevar a cabo trabajo que se vaya a realizar y evitar material innecesario que dificulte el buen funcionamiento de la vitrina, así como movimientos de brazos innecesarios.
- Situar las operaciones que generan la contaminación a una distancia no inferior a 15 ó 20 cm del plano de abertura de la vitrina.
- Evitar la generación de contaminantes a velocidades altas.
- Situar la zona de generación de contaminantes lo más baja posible para favorecer la salida de contaminantes por la ranura inferior del plenum de extracción (deflector trasero) con el fin de evitar su diseminación en la parte superior de la vitrina donde se suelen formar turbulencias que pueden provocar que el tiempo de residencia del contaminante en la vitrina sea mayor.
- Evitar la obstrucción de paso de aire al deflector trasero.
- Manipular las mínimas cantidades necesarias de producto.
- Reducir la abertura de la vitrina al mínimo espacio compatible con el trabajo que se va a realizar y estar siempre por debajo de la altura operacional máxima. No introducir la cabeza en al cámara interior de la vitrina.
- No operar en la vitrina con las ventanas vertical y horizontal, en su caso, abiertas a la vez.
- Realizar movimientos lentos con el fin de evitar turbulencias.
- Mantener los criterios de uso de ropa y equipos de protección adecuados (gafas, bata, guantes).
- En caso de detectar una anomalía en la aspiración, cerrar la guillotina y dar a conocer la situación. No utilizar la vitrina y señalarla convenientemente como fuera de uso o averiada.

8.9.1.3 Después de la utilización

- Dejar la vitrina limpia y ordenada.
- Cerrar la guillotina y dejar la vitrina funcionando hasta que se haya eliminado la contaminación generada.

8.9.2 Mantenimiento

La vitrina debe tener un programa de mantenimiento preventivo con el fin de prolongar su vida útil y mantener la seguridad del operador. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante o suministrador y todo el sistema desde la entrada de la vitrina hasta el conducto de salida debe estar sometido a inspecciones periódicas, registrando y anotando la última revisión realizada.

8.10 PREVENCIÓN DEL RIESGO EN EL LABORATORIO: ELEMENTOS DE PROTECCIÓN Y ACTUACIÓN EN CASOS DE EMERGENCIA

8.10.1 Introducción

La experiencia indica que los pequeños incidentes o accidentes que se producen en los laboratorios pueden ser controlados y tener unos efectos mínimos si se dispone de elementos de actuación adecuados y en número suficiente.

La eficacia de estos elementos está supeditada a su idoneidad y correcto funcionamiento, su buen estado de mantenimiento, y a un suficiente entrenamiento y formación del personal de laboratorio.

Los denominados elementos de actuación están constituidos básicamente por: duchas de seguridad, fuentes lavaojos, mantas ignífugas, extintores y neutralizadores. En la actualidad no existe ninguna legislación que regule la instalación de estos elementos en los laboratorios, salvo en aquellos aspectos relativos a la protección de incendios que se indican en la Norma Básica de Edificación (NBE-CPI 96 y anteriores). No obstante, la instalación de elementos de actuación y el establecimiento de un programa para su mantenimiento y utilización debe constituir una exigencia dentro del plan de emergencia y prevención de riesgos del laboratorio

8.10.2 Elementos de protección. Características

Los elementos de actuación y protección, **Figura 8.2**, son sistemas que deben permitir una rápida actuación para el control de incidentes producidos en el laboratorio, tales como incendios y derrames, así como para la descontaminación de personas que hayan sufrido una proyección, salpicadura o quemadura. Su número y ubicación (que se comentan más adelante) están, relacionados con la distribución, los productos manipulados y almacenados y las operaciones que se lleven a cabo en el laboratorio.

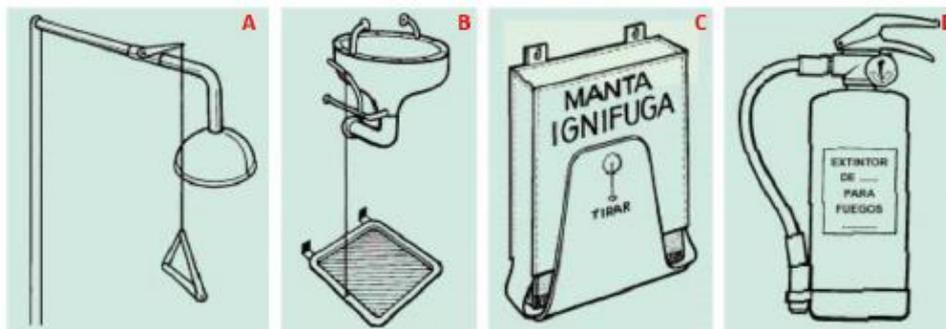


Figura 8.2 Elementos de actuación y protección. A) ducha de seguridad, B) Fuente lavaojos, C) Manta ignífuga, D) Extintores.

8.10.2.1 Duchas de seguridad

Constituyen el sistema de emergencia más habitual para casos de proyecciones con riesgo de quemaduras químicas e incluso si se prende fuego en la ropa. A continuación se resumen las características más importantes que se requieren de una ducha de seguridad (**Figura 8.2-A**).

La ducha deberá proporcionar un caudal de agua suficiente para empapar al sujeto completa e inmediatamente. El agua suministrada debe ser potable, procurando que no esté fría (preferiblemente entre 20 y 35 ° C) para evitar el riesgo que supone enfriar a una persona quemada en estado de shock y también que la poca aceptación del agua fría cause una eliminación insuficiente del contaminante, al acortar el periodo de ducha. Asimismo es conveniente que disponga de desagüe (facilita enormemente su mantenimiento).

Las llaves de paso de agua de la instalación deben estar situadas en un lugar no accesible para el personal, al objeto de evitar que se corte el suministro de manera permanente por existencia de fugas u otras anomalías, que, por otra parte, deben ser inmediatamente comunicadas y reparadas. De este modo, las llaves se cerrarán exclusivamente en el momento de efectuar la reparación

8.10.2.2 Fuentes lavaojos

Es un sistema que debe permitir la descontaminación rápida y eficaz de los ojos y que está constituido básicamente por dos rociadores o boquillas (hay modelos con una sola) separadas entre 10 y 20 cm capaces de proporcionar un chorro de agua potable para lavar los ojos o la cara, una piletta, de 25 a 35 cm, provista del correspondiente desagüe, de un sistema de fijación al suelo o a la pared y de un accionador de pie (pedal) o de codo (**Figura 8.2-B**).

El chorro proporcionado por las boquillas debe ser de baja presión para no provocar daño o dolor innecesario. Igual que se ha indicado para la ducha, el agua debe ser potable y es recomendable que sea templada. Con las llaves

de paso del agua de la instalación se tendrán las mismas precauciones que para las duchas de seguridad.

8.10.2.3 Mantas ignífugas

Las mantas permiten una acción eficaz en el caso de fuegos pequeños y sobre todo cuando se prende fuego en la ropa, como alternativa a las duchas de seguridad (**Figura 8.2-C**). La utilización de la manta puede en ciertos casos evitar el desplazamiento del sujeto en llamas, lo que ayuda a limitar el efecto y desarrollo de éstas.

Existen en el mercado distintos mecanismos de almacenamiento que permiten su rápida utilización. Como material de la manta, descartada la utilización de amianto, existen actualmente alternativas basadas en fibra de vidrio y otros tejidos ignífugos o tratados con ignífugantes.

Una alternativa a las mantas ignífugas es la utilización de prendas o textiles poco combustibles o previamente humedecidos.

8.10.2.4 Extintores

Si no es factible controlar los pequeños incendios que se producen en el laboratorio, por su ubicación, características, persistencia o extensión, con mantas ignífugas o textiles mojados, hay que recurrir a los extintores (**Figura 8.2-D**).

Dado que existen distintos tipos de fuego, que se clasifican según se trate de sólidos, líquidos, gases, metales o de origen eléctrico, debe decidirse en cada caso el agente extintor adecuado: agua pulverizada o a chorro, polvo, polvo polivalente, espuma, hidrocarburos halogenados o CO₂ (**Figura 8.3**).

Para su uso en el laboratorio, la experiencia demuestra que los más prácticos y universales son los de CO₂, ya que, dada la presencia de instrumental eléctrico delicado y productos químicos reactivos, otros agentes extintores podrían producir agresiones irreparables a los equipos o nuevos focos de incendios. Debe tenerse en cuenta, además, que el extintor portátil, que debe ser de fácil manejo y poco peso, puede volcar, romper o proyectar el material de vidrio que se halla en las poyatas, generando, asimismo, nuevos focos de incendio, vertidos o reacciones imprevistas. Es totalmente desaconsejable la utilización de extintores no adecuados a las características del material que arde, ya que pueden favorecer el desarrollo del incendio.

Clases de fuego	Agentes extintores						
	Agua chorro	Agua pulverizada	Espuma física	Polvo seco	Polvo polivalente	Nieve carbónica CO ₂	Halones
A SÓLIDOS	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
B LÍQUIDOS	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI
C GASES	NO Extingue SI Limita propagación			SI	SI	SI	SI
D METALES	NO*	NO*	NO*	NO*	NO*	NO*	NO*
E ELÉCTRICOS	NO	SI HASTA 20.000 V	NO	SI	SI HASTA 1.000 V	SI	SI

CLAVES: **SI** Bueno **SI** Aceptable **NO** Inaceptable o Peligroso
* REQUIERE AGENTES ESPECIALES

Figura 8.3 Distintos tipos de agentes extintores en función del tipo de fuego.

8.10.2.6 Situación, instalación y mantenimiento

Los elementos de actuación y protección deben situarse en lugares de fácil accesibilidad desde cualquier lugar del laboratorio, y lo más cerca posible de las zonas de mayor riesgo, procurando que su ubicación no genere un nuevo riesgo para el laboratorio.

En la siguiente **Figura 8.5** se resumen a modo de recomendación una serie de aspectos relativos a la situación de los diversos elementos de actuación, y a su control y mantenimiento.

ELEMENTOS DE ACTUACIÓN	SITUACIÓN	CONTROL Y MANTENIMIENTO ^{A)}
DUCHA FUENTE LAVAOJOS	Lugar alcanzable en menos de 15 s desde cualquier puesto de trabajo. En dirección a la salida habitual del laboratorio.	Comprobación mensual del caudal de agua y correcto funcionamiento del sistema.
MANTA IGNÍFUGA	Laboratorio, o unidad, en que se trabaje con productos inflamables. Cerca de la mesa de trabajo.	No precisa mantenimiento.
EXTINTOR	Ver NBE-CPI/96 Laboratorio, o unidad, en que se trabaje con productos inflamables. En un extremo de la mesa de trabajo y en la dirección habitual de salida del laboratorio. Almacén de productos inflamables.	Revisión anual y retimbrado cada 5 años. Debe estar contemplado en el plan general de medios de extinción del edificio.

Figura 8.4 Situación, control y mantenimiento de elementos de actuación.

8.10.3 Señalización, información y formación

La presencia en los laboratorios de diferentes elementos de actuación y protección no implica que los aspectos de seguridad por ellos cubiertos se den por resueltos. Su eficacia radica, no sólo en que estén en perfecto estado de utilización, sino que el personal de laboratorio conozca su ubicación y sus condiciones de utilización. Ello hace necesario que todos los elementos de

actuación estén correctamente señalizados y que el personal de laboratorio este informado, formado y entrenado (**Figura 8.6**).



Figura 8.5 Señalización de los elementos de actuación.

El personal debe conocer la utilidad, situación y condiciones de utilización de las duchas de seguridad y fuentes lavaojos, especialmente en aquellos aspectos tales como el tiempo mínimo que debe aplicarse agua a los ojos, habitualmente 20 minutos, tiempo de ducha o bien en qué casos es preferible quitar la ropa al accidentado, etc. En el caso de los derrames o vertidos accidentales el procedimiento de actuación establecido debe incluir la designación de responsables, así como la manera de reducir la exposición del personal y la dispersión de la contaminación.

El entrenamiento es especialmente importante para el uso de los extintores, ya que debido a su peso y a la rapidez con que se agota su contenido, su empleo puede resultar no sólo inútil, sino contraproducente. En caso de duda sobre la posibilidad de controlar el fuego, es recomendable activar el plan de emergencia y proceder a la evacuación del laboratorio.

Para la instalación definitiva de los equipos debe considerarse la adaptación de las necesidades existentes a las disponibilidades de espacio, distribución, y de organización, excepto, evidentemente en las zonas de riesgo elevado, en las que primarán de manera absoluta las medidas de protección, aunque ello implique modificaciones estructurales u organizativas importantes. Los casos especiales deben considerarse de manera independiente, como sería el de los laboratorios docentes o de prácticas en donde en determinados momentos puede haber un elevado número de personas poco expertas en espacios relativamente grandes, o bien laboratorios donde se manipulan sustancias o fuentes radiactivas, con elevado riesgo biológico o de incendio y explosión.

8.11 EQUIPOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL

8.11.1 Gafas

Las gafas tienen el objetivo de proteger los ojos del trabajador. Para que resulten eficaces, requieren combinar junto con unos oculares de resistencia

adecuada, un diseño o montura o bien unos elementos adicionales adaptables a ella, con el fin de proteger el ojo en cualquier dirección. Considerando el tipo de montura se pueden agrupar en:

- Gafas tipo universal, pueden ir provistas de protección adicional.
- Gafas tipo copa o cazoleta. Encierran cada ojo aisladamente. Están constituidas por dos piezas, integrando el aro portaocular y la protección lateral. También puede ser adaptables al rostro con un único ocular.
- Gafas integrales. La protección adicional está incluida en la misma montura. Pueden ser utilizadas conjuntamente con gafas graduadas.

8.11.2 Guantes

Los guantes de seguridad se fabrican en diferentes materiales (PVC, PVA, nitrilo, látex, neopreno, etc.) en función del riesgo que se pretende proteger. Para su uso en el laboratorio, además de la necesaria resistencia mecánica a la tracción y a la perforación, es fundamental la impermeabilidad frente a los distintos productos químicos. Téngase en cuenta que la utilización de guantes no impermeables frente a un producto, si hay inmersión o contacto directo importante, no solamente no protege sino que incrementa el riesgo. Por estos motivos, a la hora de elegir un guante de seguridad es necesario conocer su idoneidad, en función de los productos químicos utilizados, mediante el correspondiente certificado de homologación que debe ser facilitado por el suministrador.

La certificación de un guante de protección exige unos mínimos de resistencia a la tracción y a la perforación que garantice la integridad del mismo en situaciones normales de trabajo y los clasifica según los productos o familias de compuestos contra los que protege. Otros aspectos que han de considerarse en la elección de los guantes son la longitud del manguito (zona que forma el guante desde el borde superior hasta la muñeca) y el forro o revestimiento. En la elección debe prevalecer, a igualdad de características protectoras, la comodidad.

8.11.3 Prendas de protección

Para el trabajo con productos químicos es obligatorio el uso de bata (100% algodón) y calzado cerrado. La bata nunca se llevará puesta fuera del laboratorio ya que puede estar impregnada con algún compuesto químico y, sobre todo en zonas comunes como cafeterías.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en la elaboración de este Trabajo Fin de Grado se exponen a continuación:

- ✓ Se ha bioproducido con éxito el recombinámero **VKV₄** en erlenmeyers mediante fermentación de la bacteria *Escherichia coli*, genéticamente modificada con un rendimiento de 96.25 mg/L.
- ✓ Se ha modificado químicamente el polímero tipo elastina VKV₄, introduciendo grupos **fenil azido** en su cadena polimérica para obtener un polímero sensible a la luz.
- ✓ La **caracterización química** por resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja (FTIR), análisis de masas (MALDI-ToF) confirma que se ha logrado la modificación química. El rendimiento químico de reacción alcanzado es de un 72% y una conversión final del 91%.
- ✓ Se ha modificado químicamente el polímero tipo elastina VKV₄ con otros grupos funcionales: azido y ciclooctino. Los rendimientos químicos obtenidos son del 65% y 73% y conversiones del 42% y 54% respectivamente.
- ✓ Se ha producido un **hidrogel** en forma de pastilla, en un molde de teflón, por entrecruzamiento mediante irradiación UV durante 2 horas. Comprobándose, a partir de pruebas reológicas no concluyentes, la existencia de un entrecruzamiento no uniforme que varía gradualmente con la profundidad.
- ✓ Se han optimizado la técnica y los parámetros de **electrohilado** para la obtención de nanofibras monocomponente con buenas características, a partir de una disolución polimérica al 10% en peso de VKV₄-PH-N₃ en TFE, con las variables de caudal (0.01 ml/min), potencial (18 kV), distancia aguja-colector (12 cm), tiempo (15 seg) y orientación horizontal.
- ✓ Se han obtenido superficies de ITO y vidrio recubiertas de nanofibras monocomponente de VKV₄-PH-N₃ **entrecruzadas** e insolubles, mediante irradiación con luz UV [200 - 400 nm] durante un tiempo determinado experimentalmente de 2 minutos.

- ✓ Se ha realizado un completo seguimiento, mediante microscopía óptica, del procedimiento llevado a cabo en la producción, entrecruzamiento y lavado de las nanofibras.
- ✓ Mediante microscopía electrónica (**SEM**) se ha observado una morfología redondeada de las fibras con un diámetro en el rango de [0.4 μm - 1 μm]. Se han establecido las diferencias entre las fibras antes y después del entrecruzamiento y del lavado.
- ✓ Se ha realizado un cultivo celular de fibroblastos utilizando las superficies recubiertas con nanofibras entrecruzadas como soportes. La adhesión y supervivencia de las células tras 48 horas de cultivo demuestra la no toxicidad de las fibras y, por tanto, su citocompatibilidad.
- ✓ El **análisis económico** se ha realizado a partir de los costes de materiales, reactivos, equipos, personal, instalación y otros indirectos para una producción anual de 10.000 superficies recubiertas de fibras de 2.55 cm^2/ud . Este estudio revela un precio final unitario del producto de 13.77 €/ud. Mediante la comparación realizada con el precio de productos comercializados de similares características, se comprueba que el precio obtenido es del mismo orden, por ejemplo, Mimetix® de Electrospinning Company Ltd (UK) tienen un precio de 15.55 €/ud.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Eileen Gentleman, M.D.B., Molly M. Stevens, *Biomaterials*. Medical Sciences (EOLSS), 2009. **2**.
2. Alonso, L.B., *Diseño de experimento compuesto central para la optimización del contenido de sales en el medio de cultivo utilizado en un proceso biotecnológico de obtención de polímeros proteicos con potenciales aplicaciones biomédicas*, 2010, Escuela Ingenierías Industriales, UVA.
3. Duffo, G., *Materiales y materias primas, Biomateriales*, in *Guía didáctica Instituto Nacional de Educación Tecnológica* 2011: Buenos Aires.
4. Schieker, M., et al., *Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering*. *European journal of trauma*, 2006. **32**(2): p. 114-124.
5. Hutmacher, D.W., M. Sittinger, and M.V. Risbud, *Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems*. *TRENDS in Biotechnology*, 2004. **22**(7): p. 354-362.
6. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. *Biomaterials*, 2000. **21**(24): p. 2529-2543.
7. Gomes, M.E., et al., *Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties*. *Materials Science and Engineering: C*, 2002. **20**(1): p. 19-26.
8. Anselme, K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*. *Biomaterials*, 2000. **21**(7): p. 667-681.
9. O'Brien, W.J., *Dental materials and their selection*. 1997: Quintessence Publ.
10. Williams, R., *Surface modification of biomaterials: Methods analysis and applications*. 2010: Elsevier.
11. Vo-Dinh, T. and B. Cullum, *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 2000. **366**(6-7): p. 540-551.
12. Rossen, L., et al., *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*. *International journal of food microbiology*, 1992. **17**(1): p. 37-45.
13. Ryou, M. and C.C. Thompson, *Tissue adhesives: a review*. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 2006. **8**(1): p. 33-37.
14. Mikos, A.G., et al., *Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation*. *Journal of biomedical materials research*, 1993. **27**(2): p. 183-189.
15. Binnaz Hazar Yourç, A.a.C.S., B, *Biomaterials*, in *Yıldız Technical University, Science and Technology Application and Research Center* 2013, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Marmara University, Faculty of Dentistry: Turquía.
16. Uitto, J., *Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1979. **72**(1): p. 1-10.

17. Mithieux, S.M. and A.S. Weiss, *Elastin*. Advances in protein chemistry, 2005. **70**: p. 437-461.
18. Debelle, L. and A. Tamburro, *Elastin: molecular description and function*. The international journal of biochemistry & cell biology, 1999. **31**(2): p. 261-272.
19. Urry, D.W., *Protein elasticity based on conformations of sequential polypeptides: the biological elastic fiber*. Journal of protein chemistry, 1984. **3**(5-6): p. 403-436.
20. Urry, D.W., *Characterization of soluble peptides of elastin by physical techniques*. Methods in enzymology, 1982. **82**: p. 673.
21. Cox, B., B. Starcher, and D. Urry, *Coacervation of α -elastin results in fiber formation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1973. **317**(1): p. 209-213.
22. Herrero-Vanrell, R., et al., *Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release*. Journal of Controlled Release, 2005. **102**(1): p. 113-122.
23. Urry, D.W., *Molecular machines: how motion and other functions of living organisms can result from reversible chemical changes*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1993. **32**(6): p. 819-841.
24. Arias, F.J., et al., *Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano (bio) technological applications*. Biotechnology letters, 2006. **28**(10): p. 687-695.
25. Urry, D.W., *What sustains life?: consilient mechanisms for protein-based machines and materials*. 2007: Springer Science & Business Media.
26. Rodríguez-Cabello, J.C., et al., *Genetic engineering of protein-based polymers: The example of elastinlike polymers*, in *Ordered Polymeric Nanostructures at Surfaces*. 2006, Springer. p. 119-167.
27. Rodríguez-Cabello, J.C., et al., *Recombinamers' as advanced materials for the post-oil age*. Polymer, 2009. **50**: p. 5159-5169.
28. Rabotyagova, O.S., P. Cebe, and D.L. Kaplan, *Protein-based block copolymers*. Biomacromolecules, 2011. **12**(2): p. 269-289.
29. Duncan, R., *The dawning era of polymer therapeutics*. Nature Reviews Drug Discovery, 2003. **2**(5): p. 347-360.
30. Nettles, D.L., A. Chilkoti, and L.A. Setton, *Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering*. Advanced drug delivery reviews, 2010. **62**(15): p. 1479-1485.
31. McDaniel, J.R., D.J. Callahan, and A. Chilkoti, *Drug delivery to solid tumors by elastin-like polypeptides*. Advanced drug delivery reviews, 2010. **62**(15): p. 1456-1467.
32. Smart, T., et al., *Block copolymer nanostructures*. Nano Today, 2008. **3**(3): p. 38-46.
33. Huang, L., et al., *Generation of synthetic elastin-mimetic small diameter fibers and fiber networks*. Macromolecules, 2000. **33**(8): p. 2989-2997.
34. Lee, T., et al., *Thermo-reversible self-assembly of nanoparticles derived from elastin-mimetic polypeptides*. Advanced Materials, 2000. **12**(15): p. 1105-1110.

35. Rodríguez-Cabello, J.C., et al., *Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers*. *Nanomedicine*, 2011. **6**(1): p. 111-122.
36. Reguera Gómez, J., *Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad*. 2008.
37. Gulrez, S.K., G.O. Phillips, and S. Al-Assaf, *Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications*. 2011: INTECH Open Access Publisher.
38. Hennink, W. and C. Van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**: p. 223-236.
39. Nguyen, K.T. and J.L. West, *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, 2002. **23**(22): p. 4307-4314.
40. TIP, T., *Light sources and conditions for photoactivation of aryl azide crosslinking and labeling reagents*.
41. Tsao, M.-L. and M.S. Platz, *Photochemistry of ortho, ortho'dialkyl phenyl azides*. *Journal of the American Chemical Society*, 2003. **125**(39): p. 12014-12025.
42. de Loera Carrera, D.A., E. Leyva, and R.J. Cataño, *Fotoquímica de azidas aromáticas: intermediarios, reacciones y su aplicación biológica*. 2009.
43. Smith, K.A., et al., *A New Class of Nonionic Photosensitive Surfactants: Some Insights Concerning Conformations*. 2005.
44. Serrano, C.B., *Materiales poliméricos con azobenceno para la grabación holográfica de volumen utilizando pulsos de luz*. 2014: Prensas de la Universidad de Zaragoza.
45. Hill-West, J.L., et al., *Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**(13): p. 5967-5971.
46. Sawhney, A.S., et al., *Optimization of photopolymerized bioerodible hydrogel properties for adhesion prevention*. *Journal of biomedical materials research*, 1994. **28**(7): p. 831-838.
47. An, Y. and J.A. Hubbell, *Intraarterial protein delivery via intimately-adherent bilayer hydrogels*. *Journal of controlled release*, 2000. **64**(1): p. 205-215.
48. Quinn, C.P., et al., *Photo-crosslinked copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate, poly (ethylene glycol) tetra-acrylate and ethylene dimethacrylate for improving biocompatibility of biosensors*. *Biomaterials*, 1995. **16**(5): p. 389-396.
49. Suggs, L.J. and A.G. Mikos, *Development of poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) as an injectable carrier for endothelial cells*. *Cell transplantation*, 1998. **8**(4): p. 345-350.
50. Lu, S., W.F. Ramirez, and K.S. Anseth, *Photopolymerized, multilaminated matrix devices with optimized nonuniform initial concentration profiles to control drug release*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2000. **89**(1): p. 45-51.
51. Cruise, G.M., et al., *In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly (ethylene glycol) diacrylate membranes*. *Cell transplantation*, 1998. **8**(3): p. 293-306.

52. Loeb sack, A., et al., *In vivo characterization of a porous hydrogel material for use as a tissue bulking agent*. Journal of biomedical materials research, 2001. **57**(4): p. 575-581.
53. Hill-West, J., et al., *Efficacy of a resorbable hydrogel barrier, oxidized regenerated cellulose, and hyaluronic acid in the prevention of ovarian adhesions in a rabbit model*. Fertility and sterility, 1994. **62**(3): p. 630-634.
54. Drury, J.L. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4337-4351.
55. Elisseeff, J., et al., *Photoencapsulation of chondrocytes in poly (ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **51**(2): p. 164-171.
56. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
57. Zeleny, J., *The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces*. Physical Review, 1914. **3**(2): p. 69.
58. Anton, F., *Process and apparatus for preparing artificial threads*, 1934, Google Patents.
59. Vonnegut, B. and R.L. Neubauer, *Production of monodisperse liquid particles by electrical atomization*. Journal of Colloid Science, 1952. **7**(6): p. 616-622.
60. Drozin, V.G., *The electrical dispersion of liquids as aerosols*. Journal of Colloid Science, 1955. **10**(2): p. 158-164.
61. Simons, H.L., *Process and apparatus for producing patterned non-woven fabrics*, 1966, Google Patents.
62. Baumgarten, P.K., *Electrostatic spinning of acrylic microfibers*. Journal of colloid and interface science, 1971. **36**(1): p. 71-79.
63. Bellan, L.M. and H.G. Craighead, *Applications of controlled electrospinning systems*. Polymers for Advanced Technologies, 2011. **22**(3): p. 304-309.
64. Chew, S., et al., *The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine*. Current pharmaceutical design, 2006. **12**(36): p. 4751.
65. Kidoaki, S., I.K. Kwon, and T. Matsuda, *Mesoscopic spatial designs of nano-and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques*. Biomaterials, 2005. **26**(1): p. 37-46.
66. Liang, D., B.S. Hsiao, and B. Chu, *Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications*. Advanced drug delivery reviews, 2007. **59**(14): p. 1392-1412.
67. Yarin, A.L., S. Koombhongse, and D.H. Reneker, *Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers*. Journal of Applied Physics, 2001. **90**(9): p. 4836-4846.
68. Khanlou, H.M., et al., *Multi-response analysis in the processing of poly (methyl methacrylate) nano-fibres membrane by electrospinning based on response surface methodology: Fibre diameter and bead formation*. Measurement, 2015. **65**: p. 193-206.

69. Pham, Q.P., U. Sharma, and A.G. Mikos, *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review*. Tissue Eng, 2006. **12**(5): p. 1197-211.
70. Li, Z. and C. Wang, *Effects of Working Parameters on Electrospinning*, in *One-Dimensional nanostructures*. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 15-28.
71. Koski, A., K. Yim, and S. Shivkumar, *Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning*. Materials Letters, 2004. **58**(3-4): p. 493-497.
72. Duque Sánchez, L.M., *Electrospinning : la era de las nanofibras*, ed. L. Rodríguez and M. López. 2013: Universidad del País Vasco.
73. Doshi, J. and D.H. Reneker. *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. in *Industry Applications Society Annual Meeting, 1993., Conference Record of the 1993 IEEE*. 1993. IEEE.
74. Darrell, H.R. and C. Iksoo, *Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning*. Nanotechnology, 1996. **7**(3): p. 216.
75. Zhang, C., et al., *Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats*. European Polymer Journal, 2005. **41**(3): p. 423-432.
76. Yördem, O.S., M. Papila, and Y.Z. Menciloğlu, *Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology*. Materials & Design, 2008. **29**(1): p. 34-44.
77. Yuan, X., et al., *Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning*. Polymer International, 2004. **53**(11): p. 1704-1710.
78. Mit-uppatham, C., M. Nithitanakul, and P. Supaphol, *Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2004. **205**(17): p. 2327-2338.
79. Casper, C.L., et al., *Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process*. Macromolecules, 2004. **37**(2): p. 573-578.
80. Jiang, G., et al., *An improved free surface electrospinning with micro-bubble solution system for massive production of nanofibers*. Materials Letters, 2015. **144**: p. 22-25.
81. Liu, Y., et al., *Multi-jet electrospinning via auxiliary electrode*. Materials Letters, 2015. **141**: p. 153-156.
82. Nagy, Z.K., et al., *High speed electrospinning for scaled-up production of amorphous solid dispersion of itraconazole*. Int J Pharm, 2015. **480**(1-2): p. 137-42.
83. Wu, J., et al., *Electrospinning of multilevel structured functional micro-/nanofibers and their applications*. Journal of Materials Chemistry A, 2013. **1**(25): p. 7290-7305.
84. Zhu, W., et al., *Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration*. Nanomedicine, 2015. **11**(3): p. 693-704.
85. Espectroscopía, A.V.-D.d., *Sistemas FTIR para la caracterización de polímeros: control de calidad y análisis estructural*. Agilent Technologies.

86. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Analysis*. Intertek, 2015.
87. *Espectroscopia de resonancia magnética nuclear*. Docsetools, 2015.
88. *Background and Theory Page of Nuclear Magnetic Resonance Facility*. UNSW Mark Wainwright Analytical Centre - University of Southern Wales Sydney, 2011.
89. John C. Edwards, P.D., *Principles of NMR*. Process NMR Associates LLC, 87A Sand Pit Rd, Danbury CT 06810
90. *Differential Scanning Calorimetry (DSC) Thermal Analysis*. Anderson Materials Evaluation, Inc., 2015.
91. *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. Photometrics, Inc., 2015.
92. Räder, H. and W. Schrepp, *MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of synthetic polymers*. Acta Polymerica, 1998. **49**(6): p. 272-293.
93. Jurinke, C., P. Oeth, and D. van den Boom, *MALDI-TOF mass spectrometry*. Molecular Biotechnology, 2004. **26**(2): p. 147-163.
94. Nielen, M.W., *MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers*. Mass Spectrometry Reviews, 1999. **18**(5): p. 309-344.
95. *Espectroscopia Ultravioleta Visible - Fundamentos*. Universidad de Alicante, 2015.
96. Owen, T., *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. Hewlett-Packard 12-5965-5123E. 1996, Alemania.
97. *Basic Concepts in Optical Microscopy*. Microscopy Resource Center - Olympus, 2015.
98. Salinas Fernández, S., *Optimización de un sistema de recolección celular mediante biofuncionalización con recombinámeros tipo elastina de superficies de poliestireno*. PFC. 2014: Escuela Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid.
99. Egerton, R.F., *Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM and AEM*. Springer. 2005, Department of Physics, University of Alberta.
100. *Scanning Electron Microscope (SEM)*. University Of The Witwatersrand, Johannesburg, 2015.
101. Reimer, L., *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis, Second Edition*. Measurement Science and Technology, 2000. **11**(12): p. 1826.
102. Susan Swapp, U.o.W., *Scanning Electron Microscopy (SEM)*. Geochemical Instrumentation and Analysis, 2015.
103. Corral Acero, J., *Obtención de hidrogeles fotosensibles a partir de recombinámeros tipo elastina modificados con aril azidas*. TFG. 2014: Escuela Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid.
104. *Guía de Prevención de Riesgos Laborales - Riesgo Químico*. Universidad de Salamanca. 2008.

SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS

11. SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS

11.1 ABREVIATURAS

Las abreviaturas utilizadas se resumen en las **Tabla 11.1** a continuación:

ABREV.	NOMBRE COMPLETO	ABREV.	NOMBRE COMPLETO
AA	Aminoácido	MALDI-ToF	Láser Desorción/Ionización asistido por matriz - Tiempo de Vuelo
Conv	Conversión	MQ	MilliQ
Da	Dalton	NIP	Número de Identificación del Polímero
DCC	Diciclohexilcarbodiimida	nm	Nanómetros
DCM	Diclorometano	°C	Grados centígrados
DMF	Dimetilformamida	PDMS	Polidimetilsiloxano
DMSO-D6	Dimetil sulfóxido deuterado	PM	Peso Molecular
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ECM	Matriz Extracelular	rpm	Revoluciones por minuto
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
ELP	Polímero tipo Elastina	TB	Medio Terrific Bertani
ELR	Recombinámero tipo elastina	TBm	Medio Terrific Bertani modificado
Et ₂ O	Dietil éter	TFE	Trifluoroetanol
eq	Peso equivalente	TFG	Trabajo Fin de Grado
FTIR-ATR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada	TL	Tampón de lavado
H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón	TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
IR	Infrarrojo	TS	Tampón Sonicación
ITO	Óxido de indio y estaño	Tt	Temperatura de transición
kV	Kilo Voltios	TTI	Temperatura de Transición Inversa
LB	Medio Luria Bertani	UV	UltraVioleta
lys	Lisina	v/v	Volumen/volumen
M	Molaridad	VIS	Visible

Tabla 11.1 Abreviaturas utilizadas a lo largo del TFG.

11.2 CÓDIGO AMINOÁCIDOS

La nomenclatura y abreviaturas de los 20 aminoácidos naturales se recoge en la **Tabla 11.2**:

Aminoácido	Código - 3 letras	Código - 1 letra	Aminoácido	Código - 3 letras	Código - 1 letra
Alanina	Ala	A	Isoleucina	Ile	I
Arginina	Arg	R	Leucina	Leu	L
Asparagina	Asn	N	Lisina	Lys	K
Ácido Aspártico	Asp	D	Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F	Serina	Ser	S
Glicina	Gly	G	Tirosina	Tyr	Y
Ácido Glutámico	Glu	E	Treonina	Thr	T
Glutamina	Gln	Q	Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H	Valina	Val	V

Tabla 11.2 Nomenclatura de los 20 aminoácidos.

En la **Figura 11.1**, se muestra la formulación de estos 20 aminoácidos naturales.

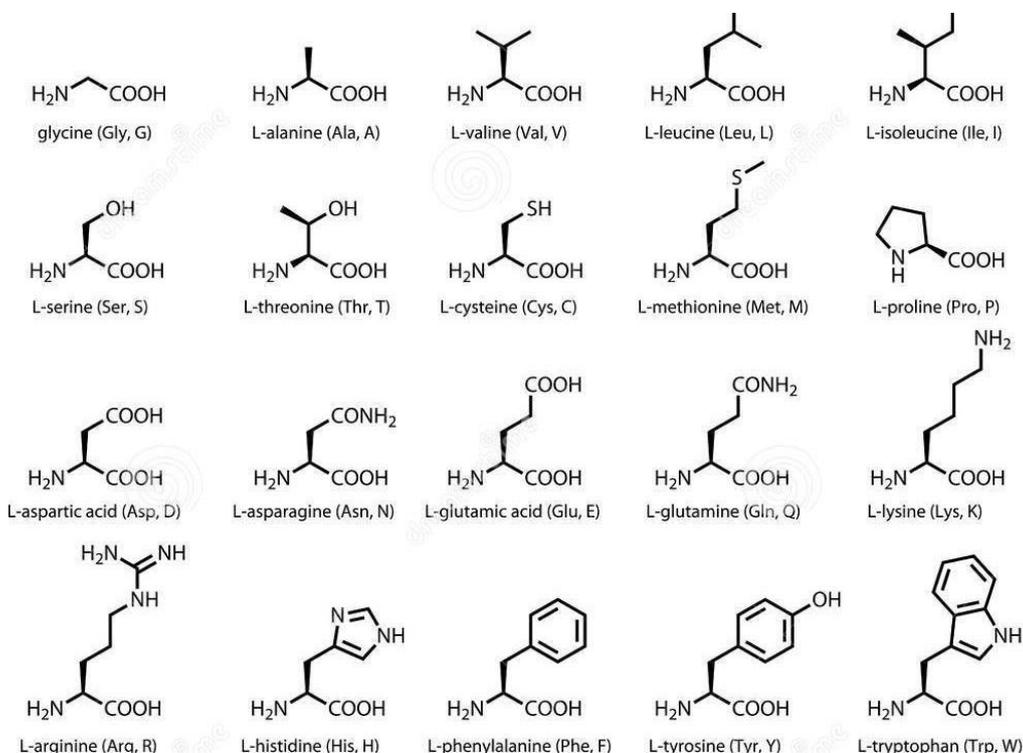


Figura 11.1 Formulación de los 20 aminoácidos.

ANEXOS

12. ANEXOS

ANEXO I. CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS

Caracterización VKV₄-N₃: FTIR, H-RMN, MALDI-ToF.

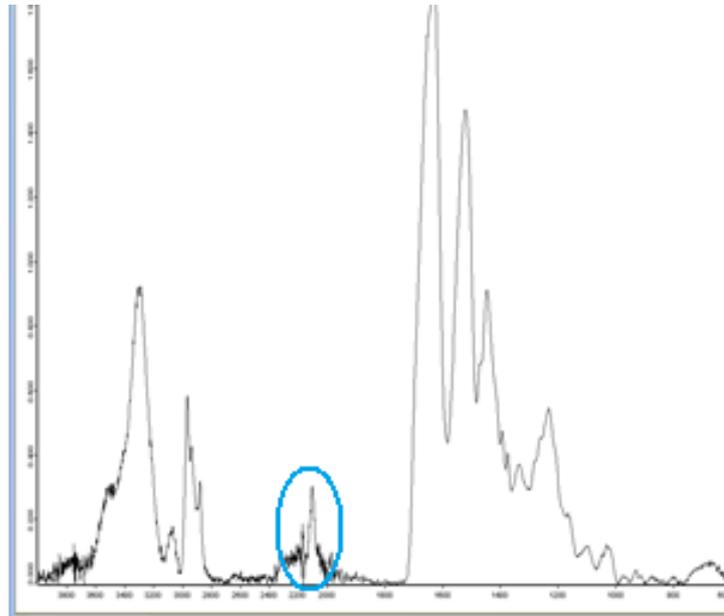


Figura 12.1 Espectros infrarrojos del polímero modificado VKV₄-N₃.

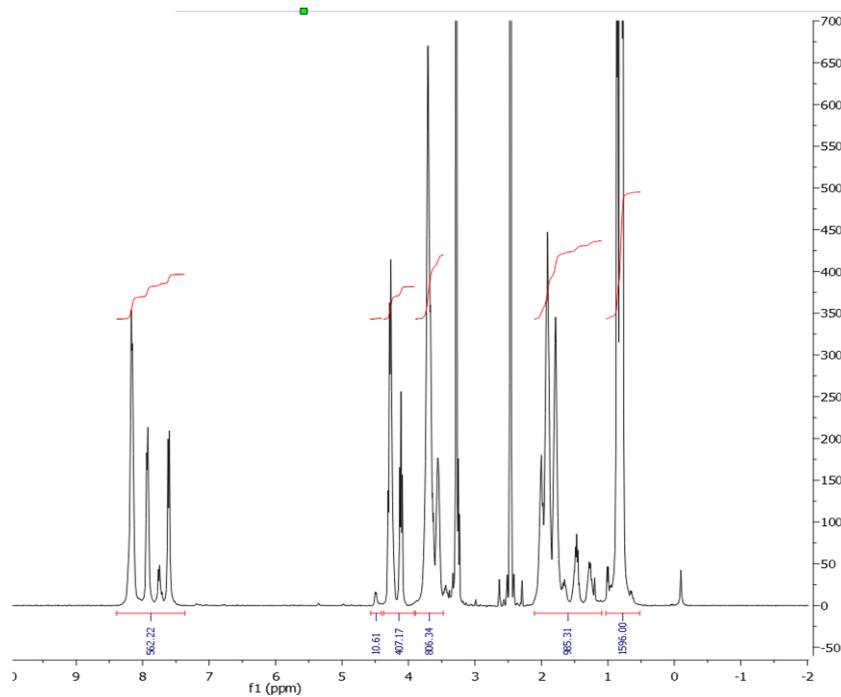


Figura 12.2 Espectro H-RMN del VKV₄-N₃

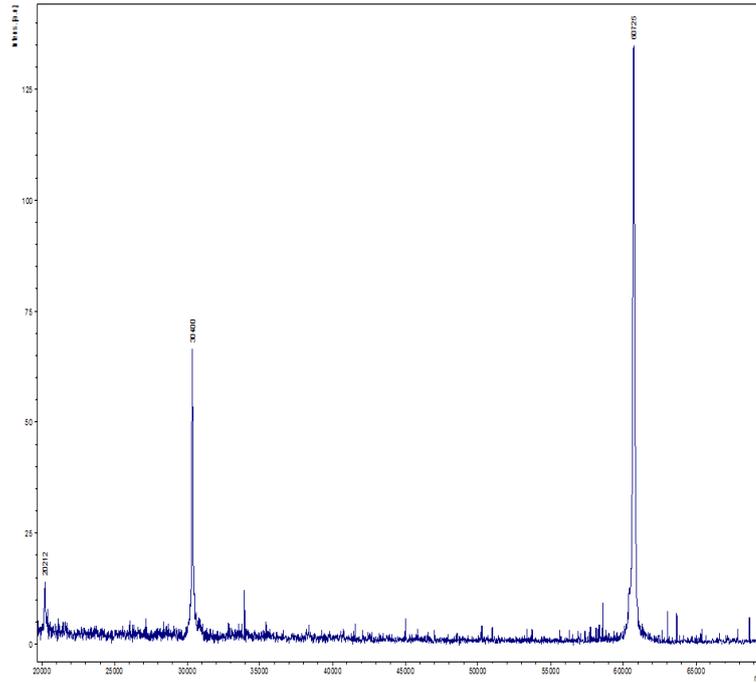


Figura 12.3 Espectrometría de masas (MALDI-ToF) del VKV₄-N₃. Conversión 42.2%.

Caracterización VKV₄-ciclooctino: FTIR, H-RMN, MALDI-ToF.

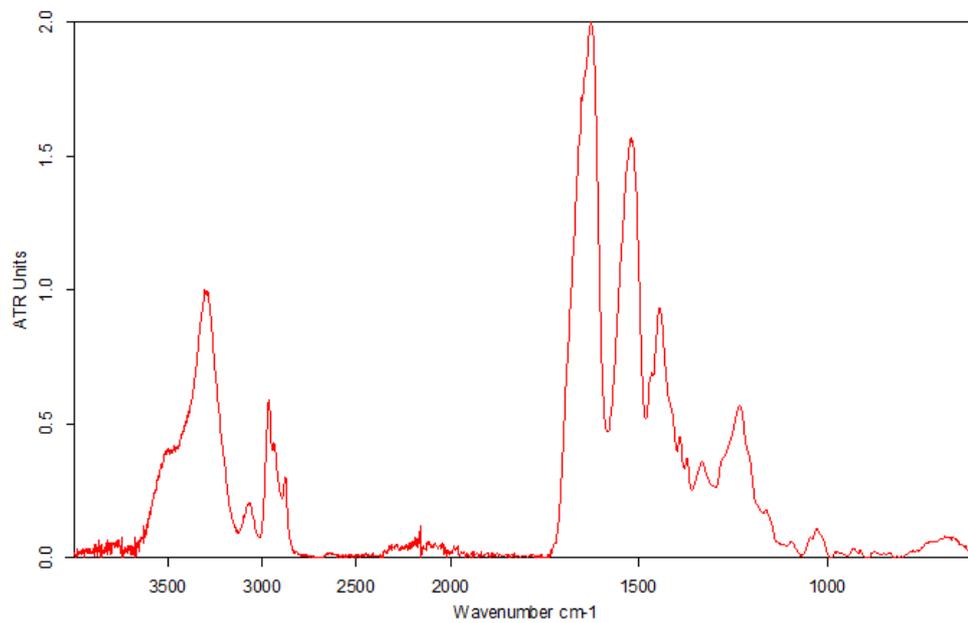


Figura 12.4 Espectro infrarrojo del polímero modificado VKV₄-ciclooctino.

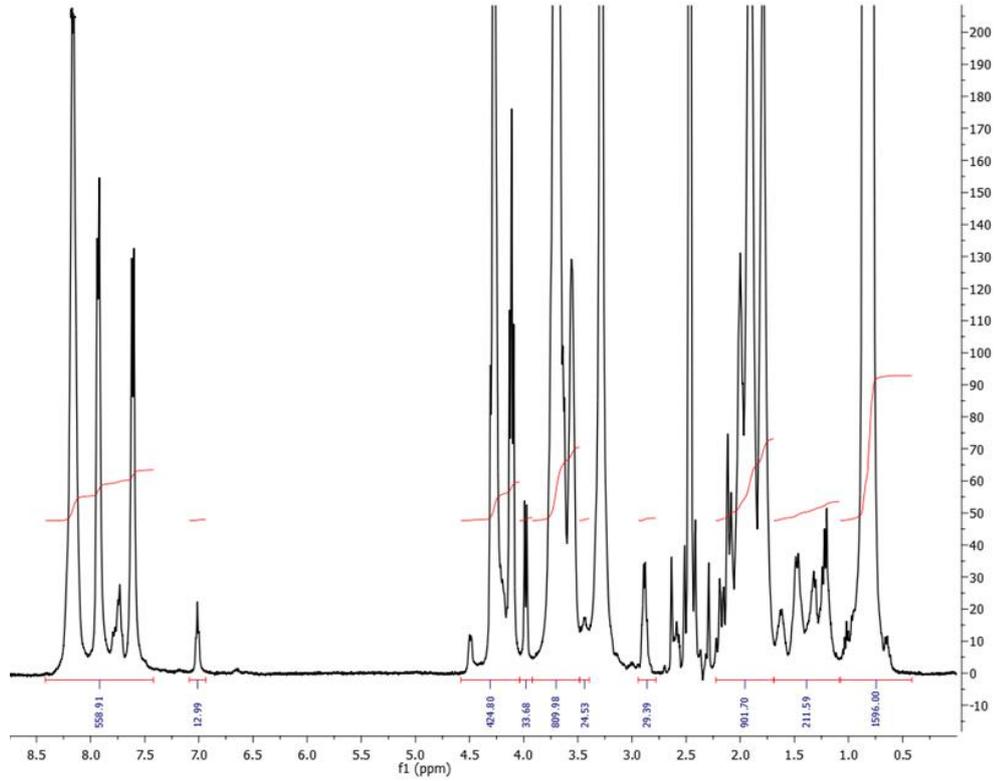


Figura 12.5 Espectro H-RMN del VKV₄-ciclooctino. Conversión=54% (13 lys).

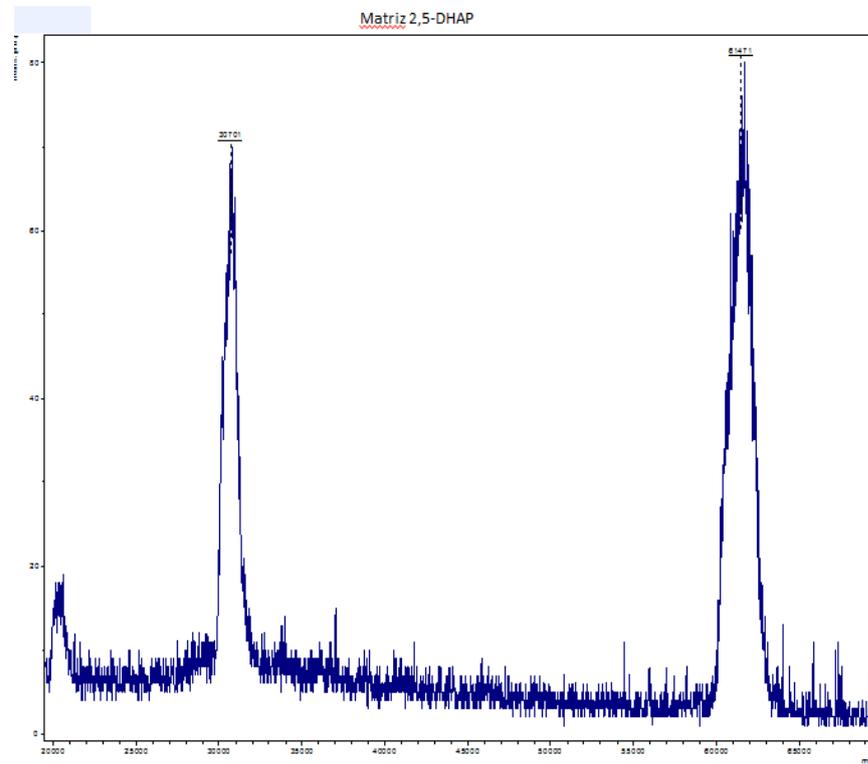


Figura 12.6 Espectrometría de masas (MALDI-ToF) del VKV₄-ciclooctino. Conv. 26%.

ANEXO II. PELIGROSIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS

A continuación se incluyen las **Figuras 12.1-12.2-12.3-12.4**, con las definiciones, las distintas categorías de peligros, los pictogramas y las frases de riesgo más características.

DEFINICIONES	IDENTIFICACIÓN
<p>Explosivos Las sustancias y preparados sólidos, líquidos, pastosos o gelatinosos que, incluso en ausencia de oxígeno del aire, puedan reaccionar de forma exotérmica con rápida formación de gases y que, en determinadas condiciones de ensayo, detonan, deflagran rápidamente o, bajo el efecto del calor, en caso de confinamiento parcial, explotan.</p>	<p>E</p>  <p>Explosivo</p>
<p>Comburentes Las sustancias y preparados que, en contacto con otras sustancias, en especial con sustancias inflamables, produzcan una reacción fuertemente exotérmica.</p>	<p>O</p>  <p>Comburente</p>
<p>Extremadamente inflamables Las sustancias y preparados líquidos que tengan un punto de ignición extremadamente bajo y un punto de ebullición bajo, y las sustancias y preparados gaseosos que, a temperatura y presión normales, sean inflamables con el aire.</p>	<p>F+</p>  <p>Extremadamente inflamable</p>
<p>Fácilmente inflamables Las sustancias y preparados:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Que puedan calentarse e inflamarse en el aire a temperatura ambiente sin aporte de energía, o • Los sólidos que puedan inflamarse fácilmente tras un breve contacto con una fuente de inflamación y que sigan quemándose o consumiéndose una vez retirada dicha fuente, o • Los líquidos cuyo punto de ignición sea muy bajo, o • Que, en contacto con agua o con aire húmedo, desprendan gases extremadamente inflamables en cantidades peligrosas. 	<p>F</p>  <p>Fácilmente inflamable</p>
<p>Inflamables Las sustancias y preparados líquidos cuyo punto de ignición sea bajo.</p>	<p>R 10 Inflamable</p>

Figura 12.7 Propiedades fisicoquímicas de las sustancias químicas.

Propiedades toxicológicas

DEFINICIONES		IDENTIFICACIÓN
<p>Muy tóxicos Las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea en muy pequeña cantidad puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.</p>		<p>T+</p>  <p>Muy tóxico</p>
<p>Tóxicos Las sustancias y preparados que, por inhalación ingestión o penetración cutánea en pequeñas cantidades puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.</p>		<p>T</p>  <p>Tóxico</p>
<p>Nocivos Las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan provocar efectos agudos o crónicos e incluso la muerte.</p>		<p>Xn</p>  <p>Nocivo</p>
<p>Corrosivos Las sustancias y preparados que, en contacto con tejidos vivos puedan ejercer una acción destructiva de los mismos.</p>		<p>C</p>  <p>Corrosivo</p>
<p>Irritantes Las sustancias y preparados no corrosivos que, en contacto breve, prolongado o repetido con la piel o las mucosas puedan provocar una reacción inflamatoria.</p>		<p>Xi</p>  <p>Irritante</p>
<p>Sensibilizantes Las sustancias y preparados que, por inhalación o penetración cutánea, puedan ocasionar una reacción de hipersensibilidad, de forma que una exposición posterior a esa sustancia o preparado dé lugar a efectos negativos característicos.</p>	<p>por inhalación</p>	<p>R42</p> <p>Xn</p>  <p>Nocivo</p>
	<p>por contacto cutáneo</p>	<p>R43</p> <p>Xi</p>  <p>Irritante</p>

Figura 12.8 Propiedades toxicológicas de las sustancias químicas.

Efectos específicos sobre la salud

DEFINICIONES	IDENTIFICACIÓN	
<p>Carcinogénicos Las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, puedan producir cáncer o aumentar su frecuencia.</p>	Categorías 1 y 2	T  Tóxico
	Categoría 3	Xn  Nocivo
<p>Mutagénicos Las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, puedan producir alteraciones genéticas hereditarias o aumentar su frecuencia.</p>	Categorías 1 y 2	T  Tóxico
	Categoría 3	Xn  Nocivo
<p>Tóxicos para la reproducción Las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea, puedan producir efectos negativos no hereditarios en la descendencia, o aumentar la frecuencia de éstos, o afectar de forma negativa a la función o a la capacidad reproductora.</p>	Categorías 1 y 2	T  Tóxico
	Categoría 3	Xn  Nocivo

Figura 12.9 Efectos específicos de las sustancias químicas sobre la salud.

Efectos sobre el medio ambiente

DEFINICIONES	IDENTIFICACIÓN
<p>Peligrosos para el medio ambiente Las sustancias o preparados que presenten o puedan presentar un peligro inmediato o futuro para uno o más componentes del medio ambiente.</p>	N  Peligroso para el medio ambiente

Figura 12.10 Efectos específicos de las sustancias químicas sobre el medio ambiente.