

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Grado

**Membranas de Poliacrilonitrilo
funcionalizadas con Óxido de Grafeno para
su aplicación en la regeneración de tejido
neuronal**

**(Polyacrylonitrile membranes functionalized
with graphene oxide nanomaterials for
neuronal tissue regeneration)**

Para acceder al Título de

Graduado en Ingeniería Química

Autor: Jorge Reyero Salgado

TÍTULO	Membranas de Poliacrilonitrilo funcionalizadas con Óxido de Grafeno para su aplicación en la regeneración de tejido neuronal		
AUTOR	Jorge Reyero Salgado		
DIRECTOR/CODIRECTOR	Nazely Diban-Ibrahim Gómez / Sandra Sánchez González		
TITULACIÓN	<i>Grado en Ingeniería Química</i>	FECHA	13/10/2017

PALABRAS CLAVE

Poliacrilonitrilo, grafeno, in vitro, regeneración neuronal, ingeniería tisular

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ingeniería tisular (IT) estudia nuevos materiales que sirvan para cultivar tejidos que posteriormente reemplacen tejidos del cuerpo humano que se hayan dañado o sirvan para crear nuevos órganos. Además, también estudia la aplicación de estos nuevos materiales en el cultivo de tejido que se utilice como modelos en el ensayo clínico de nuevas técnicas tratamiento. En este sentido, la velocidad de degradación baja del poliacrilonitrilo (PAN) lo hace un excelente candidato para este tipo de aplicaciones.

El PAN ha demostrado buenas propiedades para su uso en aplicaciones biomédicas [1, 2]. En concreto, el PAN ha sido estudiado por el grupo de Tecnologías Ambientales y de Bioprocesos (TAB) del Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular de la Universidad de Cantabria como material biocompatible y para la fabricación de estructuras soporte en forma de membranas planas de crecimiento celular para aplicaciones en IT.

Este estudio se ha enfocado a la aplicación de membranas planas de PAN funcionalizadas con nanopartículas de óxido de grafeno (GO) con el fin de que las estructuras de soporte celular potencien la regeneración de tejido neuronal [3]. En el presente estudio se ha llevado a cabo la caracterización de propiedades físico-químicas, eléctricas y de transporte de nutrientes de las membranas de PAN control y de PAN/GO funcionalizadas.

RESULTADOS

Previo a la funcionalización de las membranas de PAN se estudió la influencia de las variables concentración de PAN en la disolución polimérica (10 %w/w y 15 %w/w), y el uso de distintos baños de coagulación (UP, EtOH, IPA), así como la presencia de disolvente (NMP) en el baño de coagulación de agua (NMP/W 5 %v/v y 10 %v/v). Posteriormente se seleccionaron las membranas PAN10-NMP10 sintetizadas a partir de una concentración de PAN 10%w/w y baño de coagulación NMP/W 10%v/v que dieron lugar a mayores propiedades de permeancia hidráulica (2260 ± 440 L/bar·m²·h) para proceder a la adición de GO (1 % w/w) a la composición de la membrana.

La adición de GO a estas membranas (PAN10/GO-NMP10) disminuyó la permeancia hidráulica hasta 1375 ± 89 L/bar·m²·h, valor que de acuerdo con otros estudios, es suficiente para permitir un flujo eficaz de nutrientes [4].

Los análisis termogravimétricos mostraron una mayor estabilidad térmica de la cadena polimérica en las muestras de PAN10/GO-NMP10 respecto a las PAN10-NMP10. Sin embargo los análisis FTIR no muestran diferencias químicas importantes entre las membranas de PAN10-NMP10 y las de PAN10/GO-NMP10. El post-tratamiento de curado hidrotermal de las membranas (PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10-Q) a 200 °C redujo la intensidad de algunos de los picos característicos por la aparición de reacciones químicas complejas. En el apartado de las conductividades las muestras exhiben valores discretos siendo las muestras de PAN10-NMP10-Q las que muestran un mayor valor (0.02 S/m). Las membranas con GO muestran valores menores probablemente fruto del carácter no conductor de dicho compuesto.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio, el PAN se postula como un polímero adecuado para su utilización en la fabricación de “scaffolds” que sirvan como soporte para la regeneración de tejido neuronal.

Los resultados indicaron que las propiedades de las membranas dependen en gran parte de la concentración del PAN en la disolución polimérica. Además, el estudio ha demostrado que la incorporación de un 10% de disolvente (NMP) en el baño de agua UP mejora las propiedades de permeabilidad hidráulica respecto del uso de EtOH e IPA asociado a un mayor grado de porosidad durante el proceso de intercambio de fases durante la coagulación de la membrana.

Se propone para futuros trabajos el estudio del aumento de la concentración de GO para alcanzar el valor límite de percolación eléctrica, así como la sustitución de GO por grafeno como material conductor. Además, el efecto de la presencia de GO en las membranas PAN/GO sobre la proliferación y diferenciación celular debe ser analizado.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] MORELLI, S. [et al.] 2012. Flat and tubular membrane systems for the reconstruction of hippocampal neuronal network. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (6), pp. 299-313
- [2] DE BARTOLO, L. [et al] 2008. Influence of membrane Surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. *Journal of Membrane Science* (325), pp. 139-149
- [3] MANZO, L.P. [et al] 2017. Magnetic, but not non-magnetic, reduced graphene oxide in spinal cord increases nociceptive neuronal responsiveness. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (13), pp. 1841-1851
- [4] DIBAN, N; SÁNCHEZ-GONZALEZ, S; LÁZARO-DÍEZ, M; RAMOS-VIVAS, J; URTIAGA, A. 2017. Facile fabrication of poly(ϵ -caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering. *Journal of Membrane Science* (540), pp. 219-228

TÍTULO	Polyacrylonitrile membranes functionalized with graphene oxide nanomaterials for neuronal tissue regeneration		
AUTOR	Jorge Reyero Salgado		
DIRECTOR/CODIRECTOR	Nazely Diban-Ibrahim Gómez / Sandra Sánchez González		
TITULACIÓN	<i>Grado en Ingeniería Química</i>	FECHA	13/10/2017

KEYWORDS

Polyacrylonitrile, Graphene, in vitro, neuronal regeneration, Tissue engineering

SCOPE

Tissue engineering (IT) studies new materials that can be used to grow tissues that later replace tissue from the human body that has been damaged or serve to create new organs. In addition, we also study the application of these new materials in tissue culture to be used as models in the clinical trial of new treatment techniques. In this sense, the low degradation rate of polyacrylonitrile (PAN) makes it an excellent candidate for this type of applications.

PAN has shown good properties for use in biomedical applications [1, 2]. In particular, it has been studied by the Environmental Technologies and Bioprocesses (TAB) group of the Department of Chemical and Biomolecular Engineering of the University of Cantabria as a biocompatible material for the manufacture of support structures in the form of “scaffolds” for IT applications.

This study has focused on the application of PAN flat membranes functionalized with graphene oxide (GO) nanoparticles in order to the cellular support structures enhance the regeneration of neuronal tissue [3]. In the present study, the characterization of physicochemical, electrical and nutrient transport properties of PAN and functionalized PAN / GO membranes has been carried out.

RESULTS

Prior to the functionalization of the PAN membranes, this study evaluated the influence of the PAN concentration variables on the polymer solution (10% w / w and 15% w / w), the use of different coagulation baths (UP, EtOH, IPA), the presence of solvent (NMP) in the water coagulation bath (NMP/W 5% v/v and 10% v/v). Subsequently, PAN10-NMP10 membranes synthesized from a concentration of PAN 10% w/w and coagulation bath NMP/W 10% v/v were selected showing higher water permeability properties (2260 ± 440 L/bar.m².h) to proceed with the addition of GO (1% w/w) to the membrane composition.

The addition of GO to these membranes (PAN10/GO-NMP10) decreased the water permeability to 1375 ± 89 L/bar.m².h, a value that according to other studies is sufficient to allow an efficient flow of nutrients [4].

The thermogravimetric analysis showed greater thermal stability of the polymer chain in samples of PAN10/GO-NMP10 compared to PAN10-NMP10. However, FTIR analyzes do not show significant chemical differences between PAN10-NMP10 and PAN10/GO-NMP10 membranes. Hydrothermal curing of the membranes (PAN10-NMP10-Q and PAN10/GO-NMP10-Q) at 200°C reduced the intensity of some of the characteristic peaks by the appearance of complex chemical reactions. In the conductivity section the samples exhibit discrete values, being the samples of PAN10-NMP10-Q those with a higher value (0.02 S / m). The membranes with GO show lower values of conductivity probably due to the non-conductive character of said compound.

CONCLUSIONS

According to the results obtained in the present study, PAN could be postulated as a suitable polymer for use in the manufacture of scaffolds that serve as a support for the regeneration of neuronal tissue.

The results indicated that the properties of the membranes depend to a large extent on the concentration of PAN in the polymer solution. In addition, the study has shown that the incorporation of 10% solvent (NMP) in the UP water bath enhances the water permeability properties with respect to the use of EtOH and IPA associated to a higher degree of porosity during the exchange process of phases during the coagulation of the membrane.

It is proposed for future work the study of the increase in the concentration of GO to reach the limit value of electric percolation, as well as the substitution of GO with graphene as conductive material. In addition, the effect of the presence of GO on the PAN/GO membranes on cell proliferation and differentiation must be analyzed.

REFERENCES

- [1] MORELLI, S. [et al.] 2012. Flat and tubular membrane systems for the reconstruction of hippocampal neuronal network. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (6), pp. 299-313
- [2] DE BARTOLO, L. [et al] 2008. Influence of membrane Surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. *Journal of Membrane Science* (325), pp. 139-149
- [3] MANZO, L.P. [et al] 2017. Magnetic, but not non-magnetic, reduced graphene oxide in spinal cord increases nociceptive neuronal responsiveness. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (13), pp. 1841-1851
- [4] DIBAN, N; SÁNCHEZ-GONZALEZ, S; LÁZARO-DÍEZ, M; RAMOS-VIVAS, J; URTIAGA, A. 2017. Facile fabrication of poly(ϵ -caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering. *Journal of Membrane Science* (540), pp. 219-228

Índice

1. Introducción	8
1.1. Ingeniería tisular	8
1.2. “Scaffolds” o soportes de crecimiento celular: propiedades, materiales y funcionalización.....	9
1.3. Objetivo.....	14
2. Materiales y métodos.....	15
2.1. Preparación de membranas.....	15
2.2. Caracterización	17
1.1.1. Propiedades físico-químicas.....	17
1.1.1.1. Propiedades de transporte de flujo hidráulico.....	17
1.1.1.2. Análisis del aspecto, espesor y capacidad higroscópica de la membrana polimérica	20
1.1.1.3. Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)	20
1.1.1.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)	21
1.1.1.5. Análisis de la Voltametría	21
3. Resultados y Discusión	22
3.1. Transporte de flujo	23
3.2. Análisis del aspecto, espesor y capacidad higroscópica de la membrana	26
3.3. Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)	29
3.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)	31
3.5. Análisis de la Voltametría	33
4. Conclusiones y futuros trabajos	34
5. Referencias	37

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química del PAN	11
Figura 2. Estructura química 3D del Grafeno y Óxido de Grafeno	12
Figura 3. Esquema de preparación de membranas por la técnica de inversión de fases	15
Figura 4. Sistema experimental de flujo cruzado	17
Figura 5. Soporte de la membrana para las pruebas de flujo cruzado	18
Figura 6. Representación de flujo frente a la presión para obtener la permeancia	19
Figura 7. Comparativa de flujo cruzado entre las membranas PAN15-UP, PAN15-EtOH y PAN15-IPA.....	23
Figura 8. Comparativa de flujo cruzado entre las membranas PAN10-NMP5, PAN10-NMP10 y PAN10/GO-NMP10	24
Figura 9. Imágenes de las membranas fabricadas con diferentes concentraciones de polímero y baños de coagulación.....	26
Figura 10. Espectro FTIR de las membranas PAN10-NMP10, PAN10/GO-NMP10, PAN10-NMP10-Q, PAN10/GO-NMP10-Q y perfil del GO comercial	30
Figura 11. Análisis termogravimétrico de las membranas PAN10-NMP10, PAN10-NMP10-Q, PAN10/GO-NMP10 y PAN10/GO-NMP10-Q.....	31
Figura 12. Comparativa de conductividad para las membranas PAN10-NMP10, PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10	33

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación y codificación de las diferentes membranas fabricadas.....	16
Tabla 2. Condiciones de operación de las pruebas de flujo cruzado de agua UP.....	18
Tabla 3. Espesor e higroscopía de las membranas analizadas a lo largo del estudio	27

1. Introducción

La regeneración del sistema nervioso central (CNS) es uno de los mayores desafíos que afronta actualmente la medicina regenerativa. Al contrario que el sistema nervioso periférico (PNS), el CNS tiene una limitada capacidad de regeneración una vez que se ha dañado, principalmente debido a la formación de cicatrices gliales y la acumulación de inhibidores asociados a la mielina [1].

Desde que se conoce la influencia que el daño en el sistema nervioso central (CNS) tiene sobre el desarrollo de enfermedades como el Alzheimer o la Esclerosis múltiple, se han llevado a cabo multitud de estudios con el objetivo de descubrir mejoras terapéuticas que faciliten la regeneración y rehabilitación del CNS [2].

El daño sufrido por los tejidos y la pérdida funcional de los órganos suponen dos de los problemas más costosos y graves. Tradicionalmente dichos problemas se han paliado mediante el trasplante de órganos y tejidos. Se trata de una opción eficiente pero a la vez limitada por la baja disponibilidad de donantes y el alto riesgo de rechazo por el sistema inmunológico del paciente (incompatibilidad) y la transmisión de patógenos.

1.1. Ingeniería tisular

El trasplante de órganos ha sido desde hace tiempo objeto de debate. Sin embargo, el campo de la reparación de tejidos dañados mediante técnica de ingeniería tisular in vitro tiene aproximadamente 20 años de vida. La ingeniería tisular nace de la cirugía reconstructiva donde el trasplante de tejidos proveniente de un donante se utiliza para reparar el tejido dañado.

El trasplante de tejidos desarrollados a partir de las propias células del paciente puede evitar la mayoría de las limitaciones que el trasplante directo presenta y las dificultades relacionadas con la incompatibilidad y la transmisión de patógenos. Por todo ello, la fabricación artificial de tejidos in vitro puede ser una alternativa excelente al trasplante directo de órganos [3].

La ingeniería tisular engloba técnicas y conocimientos de una gran variedad de especialidades como la ingeniería de materiales, bioquímica, física química, etc. Su principal objetivo es el estudio, y fabricación de nuevos materiales y estructuras que potencien la regeneración de tejidos in vitro que servirán más tarde para reemplazar parcial o totalmente los tejidos dañados y crear nuevos órganos que puedan sustituir a los originales del paciente [4]. Además, estos tejidos in vitro pueden ser utilizados como modelos in vitro para el análisis de nuevos fármacos, proporcionando una muestra de mayor similitud al caso real de aplicación (sustituyendo al ensayo en animales) [5].

1.2. “Scaffolds” o soportes de crecimiento celular: propiedades, materiales y funcionalización

La regeneración de tejidos humanos por técnicas in vitro requiere de la utilización de un biorreactor. Los biorreactores son definidos como equipos en los que se llevan a cabo procesos biológicos y bioquímicos bajo una precisa monitorización y control de las condiciones medioambientales y de operación (pH, temperatura, presión, abastecimiento de nutrientes y eliminación de desechos) [6]. Los biorreactores in vitro son utilizados para mantener las condiciones de un organismo humano (pH 7.4 y 37 °C) mientras las células proliferan y regeneran el nuevo tejido.

Uno de los componentes con más importancia en el diseño del biorreactor son los “scaffolds” o estructuras soporte de crecimiento celular. Estos son elementos fabricados en 2-D o 3-D que actúan como soporte temporal y permiten la proliferación de las células para que formen un nuevo tejido. El “scaffold” imita a la matriz extracelular del tejido que debe regenerarse [7].

El objetivo de los “scaffolds” es simular una matriz extracelular favoreciendo la proliferación y diferenciación celular así como el flujo de nutrientes y desechos a través de la misma. Aunque los requisitos finales dependan del propósito para el que se ha fabricado el “scaffold”, siempre es necesario considerar una serie de características en su diseño.

Una propiedad crucial es la porosidad ya que el soporte debe de tener una elevada porosidad con una buena conexión entre los poros que asegure un eficiente flujo de nutrientes a las células así como la eliminación de productos de desecho derivados de la asimilación de dichos nutrientes por parte de las células. Además, el tamaño de poro también es un parámetro importante para permitir la penetración/infiltración celular. Aunque fabricar “scaffolds” con estructura porosa es actualmente una tarea sencilla, encontrar las propiedades superficiales adecuadas, diseñar la forma de los poros y dar con el tamaño que requieren las células para su proliferación y diferenciación con el fenotipo correcto supone el principal desafío [8]. Además, cuando el objetivo es el trasplante directo, el “scaffold” debe de tener propiedades mecánicas similares al tejido *in vivo* y debe de poder ser conectada con el sistema de vascularización del huésped [3].

Una importante propiedad a tener en cuenta cuando se selecciona el material de fabricación de los “scaffolds” debe ser su biodegradabilidad puesto que, cuando el objetivo es que el tejido regenerado sea implantado en un paciente (*in vivo*), una vez que este ha desarrollado la función de soporte, debe de poder ser absorbido por el organismo y desaparecer a medida que se da el crecimiento celular y se forma el nuevo tejido. Por otra parte, si se va a utilizar en aplicaciones relacionadas con el estudio y ensayo clínico (*in vitro*) como por ejemplo en la liberación de fármacos, conviene que la biodegradabilidad del “scaffold” sea más lenta o nula y pueda proporcionar soporte al cultivo celular durante el tiempo necesario para la evaluación del impacto del fármaco.

Otra importante propiedad que debe ser considerada es la biocompatibilidad del material con el organismo para evitar que este provoque una respuesta inmunológica adversa (reacciones alérgicas, reacciones inflamatorias crónicas, etc.).

Bajo estas premisas, los polímeros presentan una gran flexibilidad gracias a que su composición y estructura puede ser adaptada en su proceso de fabricación de acuerdo a las especificaciones requeridas. Además, han sido ampliamente estudiados en su aplicación en ingeniería tisular, por ejemplo, en la regeneración de tejido óseo [9], hepático [10, 11], nervioso [1, 2, 12] y muscular [3, 13]

Dentro de los polímeros más utilizados para la fabricación de scaffolds se encuentran varios ejemplos como Ácido poliglicólico, Poli-ε-caprolactona (PCL), Chitosan, el Poliacrilonitrilo (PAN), etc. empleados entre otras aplicaciones, en regeneración de tejido neuronal [1].

Particularmente, el PAN (Figura1) es un polímero de gran importancia comercial ya que es el precursor de aproximadamente el 90 % de las fibras de carbono fabricadas actualmente.

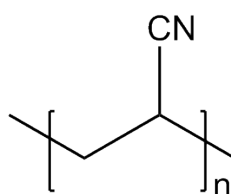


Figura 1. Estructura química del PAN

La fabricación de diferentes tipos de estructuras (nanofibras, membranas, HFs, etc) de PAN ha atraído la atención gracias a varias de sus excelentes características que incluyen estabilidad térmica, resistencia a la mayoría de disolventes y gran resistencia mecánica entre otras [14].

La biodegradabilidad lenta del PAN lo hace un excelente candidato para multitud de aplicaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* de tejidos en biorreactores de perfusión para su utilización en el ámbito del ensayo clínico. En este sentido, estudios (De Bartolo et al. [15]; Morelli et al. [2]) documentan la posibilidad de utilizar membranas de este polímero para estudiar las propiedades neurobiológicas naturales de las células del hipocampo, como la memoria y los procesos de aprendizaje, o la inducción de las patologías de enfermedad neurodegenerativas, permitiendo la prueba de nuevas terapias sobre la resolución de estos estados.

Habitualmente se añaden compuestos de carbono a las membranas de PAN para formar “composites” mejorando sus propiedades físicas y mecánicas, como la conductividad eléctrica [14]. Gracias a estas y otras propiedades ópticas, mecánicas, térmicas y eléctricas, el Grafeno y sus derivados han sido utilizados en una amplia

variedad de campos, desde el sector energético o en ingeniería electrónica, hasta la biomedicina.

Algunas revisiones sobre la aplicación del Grafeno y sus derivados han mostrado los posibles riesgos de la exposición a estos materiales debido a su citotoxicidad [16, 17]. Sin embargo, varios estudios certifican su biocompatibilidad para su uso en aplicaciones biomédicas que van desde el implante de dispositivos hasta la medicina regenerativa. Saravanan et al [18] reportan como la adición de óxido de Grafeno en un 0.25 % a “scaffolds” de Chitosan (CS) mejora la estructura porosa, la adsorción de proteínas y ayuda a controlar la degradación in vitro además de ser citocompatible y no mostrar signos de toxicidad. Junghyun y Michael [19] documentan la potencial aplicación de “nanoplatelets” de óxido de grafeno como portadores de agentes teranósticos como el Holmio. Otros como Moataz et al [20] demuestran como la conjugación de óxido de Grafeno con péptidos de penetración celular mejora la transfección de oligonucleótidos mejorando su biocompatibilidad y disminuyendo la citotoxicidad.

Existen trabajos en los que se ha encontrado que el grafeno y derivados estimulan la electroactividad de las células neuronales. Por ejemplo, Manzo et al [21] demuestran como la administración intratecal de óxido de Grafeno reducido magnético (rGO-mag) en la espina dorsal de ratones mejora la respuesta nociceptiva de estos.

El óxido de Grafeno (GO), contiene varios grupos funcionales oxigenados (Figura 2) lo que lo convierte en un candidato ideal para su aplicación en varios campos, especialmente en bioelectroquímica [22].

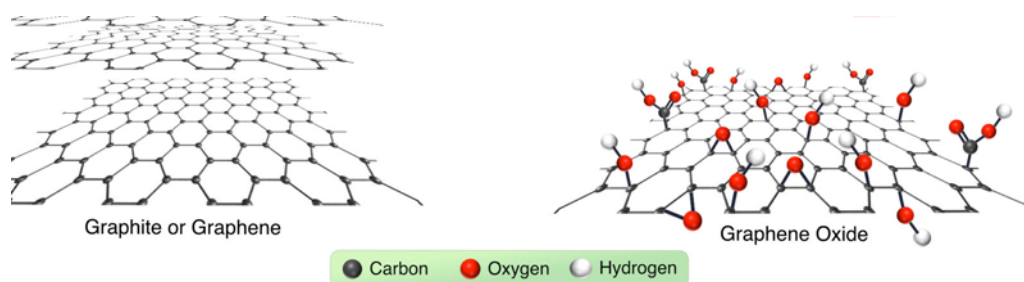


Figura 2. Estructura química 3D del Grafeno y Óxido de Grafeno

Recientemente, ha crecido el interés en los composites compuestos por un polímero y GO debido a sus excepcionales propiedades físicas, químicas y mecánicas y su elevada biocompatibilidad [14, 23, 24].

La capacidad de una membrana para proporcionar un soporte mecánico y químico adecuado para el cultivo celular depende de sus propiedades superficiales como la carga eléctrica y la morfología. Estas pueden afectar a la unión celular y su comportamiento bien indirectamente mediante la adsorción por arrastre de las proteínas presentes en el medio de cultivo (o secretadas por las células), o directamente, por ejemplo, guiando la expansión celular gracias a una topografía superficial adecuada. Estas propiedades son críticas para la interacción célula-sustrato y tienen que ser consideradas en la elección del material adecuado para la fabricación de las membranas [25]. Otro factor en el que reside el interés en la utilización de GO es, por un lado la mejora en las propiedades conductoras de la membrana (rGO). Esta mejora es especialmente interesante en aplicaciones de ingeniería tisular por su relación con la sinapsis en el tejido nervioso y neuronal.

Además trabajos documentan la potencial influencia directa que la adición de GO tiene sobre el crecimiento y diferenciación celular. En este sentido, Guo et al [26] reportan que el ensamble de una capa de rGO en la superficie de membranas de PADM contribuye a una proliferación más activa y una mayor diferenciación de las células neuronales.

1.3. Objetivo

El presente estudio ha sido llevado a cabo en el grupo de investigación de Tecnologías Ambientales y Bioprocesos del Departamento de Ingenierías Químicas y Biomolecular de la Universidad de Cantabria.

Este estudio tiene como objeto evaluar la viabilidad de la producción de membranas de PAN funcionalizadas con nanopartículas de GO mediante la técnica de inversión de fases y su aplicación para el cultivo in vitro de tejido neuronal.

La incorporación de GO en la composición de las membranas está dirigida a la mejora de las propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas y de transporte. Por otra parte, el tratamiento térmico (curado) de las membranas tiene por objetivo inducir la formación de enlace químico PAN-GO en los composites y la reducción del GO para mejorar las propiedades eléctricas.

El estudio amplía el conocimiento de la influencia la concentración polimérica en la disolución polimérica y el baño de coagulación utilizado sobre la morfología porosa de las membranas y su efecto en los fenómenos de transporte de nutrientes con el objetivo de seleccionar las condiciones experimentales más adecuadas para posteriormente llevar a cabo la funcionalización de las membranas.

Las muestras se han sometido a ensayos de flujo hidráulico cruzado atendiendo a que este tipo de flujo es el utilizado en los biorreactores de perfusión en el que las membranas están destinadas a operar. Además de las pruebas de flujo hidráulico cruzado, también se llevó a cabo un análisis termogravimétrico de las muestras con el fin de determinar su estabilidad térmica, análisis de espectroscopia FTIR para especificar la composición y estructura química final de las muestras y análisis de voltametría que mostrasen la conductividad eléctrica de las distintas muestras estudiadas así como análisis del aspecto visual, espesor e higroscopía de las membranas.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de membranas

En la figura 3 se muestra el proceso de fabricación de las membranas a partir de la técnica de inversión de fases. En primer lugar se preparó una disolución de PAN (Mw, 150kDa, Sigma Aldrich, España) utilizando como disolvente N-metilpirrolidona (NMP) (99%, Acros Organics, España) a una concentración determinada (Tabla 1). Para lograr su completa disolución se utilizó un agitador mecánico de rotación vertical (MRVS-08, SBS) durante aproximadamente 24 h y se dejó la membrana desgasificando durante la noche. A continuación, la disolución fue vertida y extendida en un cristal diseñado para dicho propósito mediante el uso de un cuchillo de casting, fijando la abertura del mismo en 200 μm . Una vez extendida la disolución, el cristal se introdujo inmediatamente después en el baño de coagulación (véase Tabla 1) donde precipitó formando la membrana que se separó espontáneamente de la placa de vidrio (Figura 3). Después, la membrana se portó a un segundo baño de coagulación de igual composición al primero, en el cual permaneció por 24 horas. Transcurrido dicho tiempo en el baño de coagulación, las membranas fueron lavadas durante 2 días con agua ultrapura (UP), cambiando el agua 3 veces al día con el fin de eliminar los restos de disolvente y coagulante presentes en las mismas.



Figura 3. Esquema de preparación de membranas por la técnica de inversión de fases

Además, se fabricaron membranas de PAN con Óxido de Grafeno (GO (Avanzare Innovación Tecnologías S.L.)) (PAN/GO) cuyas composiciones se recogen en la Tabla 1. Para lograr esto, se realizó una dispersión de GO/NMP aplicando ultrasonidos (VCX

500, Sonics & Materials, Inc.) durante 30 minutos. A continuación se disolvió el PAN en la solución de GO/NMP con agitación mecánica durante 24 horas. El resto de pasos necesarios para la fabricación de membranas (casting, inmersión y conservación en baño de coagulación y lavado con agua UP) se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento que para la fabricación de las membranas de PAN, siendo el baño de coagulación utilizado (UP/NMP 10%) (Tabla 1). Todas las membranas fabricadas se conservaron en húmedo (sumergidas en UP) para su posterior caracterización.

Una muestra de las membranas de PAN/GO fueron tratadas térmicamente o curadas sumergiéndolas en agua en un autoclave forrado de teflón y se mantuvieron a 200 °C durante 3 h. Además, para poder realizar el estudio de comparación, también se curaron membranas control sin GO.

La viscosidad de la disolución polimérica se determinó mediante la utilización de un viscosímetro rotacional (Fungilab, Alpha Series).

A continuación, la tabla 1 presenta las distintas condiciones que se han utilizado para la fabricación de las membranas:

Tabla 1. Clasificación y codificación de las diferentes membranas fabricadas

Membrana	PAN/GO (%w/w)	Baño de Coagulación
PAN15-UP PAN15-EtOH PAN15-IPA	15/0	UP EtOH IPA
PAN10-NMP5 PAN10-NMP10	10/0	NMP/UP (5%) NMP/UP (10%)
PAN10/GO-NMP10 PAN10/GO-NMP10-Q (*)	10/1 10/1	NMP/UP (10%)
PAN10-NMP10-Q (*)	10/0	NMP/UP (10%)

(*)Q: curado

2.2. Caracterización

1.1.1. Propiedades físico-químicas

1.1.1.1. Propiedades de transporte de flujo hidráulico

Para llevar a cabo el análisis del flujo cruzado de UP (hidráulico) se utilizó el sistema experimental utilizado se muestra en la Figura 4. Consiste en un tanque de 2 litros calentado con un sistema eléctrico calefactor integrado, un sistema de bombeo que genera la fuerza impulsora del fluido a través del soporte ($\text{Área} = 10 \text{ cm}^2$) en el que se aloja la membrana (Figura 5), un manómetro y una válvula que regula la presión transmembranal en el sistema. La sobrepresión ejercida sobre la disolución de alimentación hace que parte del fluido atraviese la membrana (permeado). El permeado obtenido es pesado y recogido en intervalos fijos de tiempo a partir del uso de un software (Pomiar Win V5.2.0) que está conectado a la balanza. El retenido (fluido que no pasa a través de la membrana) es recirculado al tanque de alimentación.

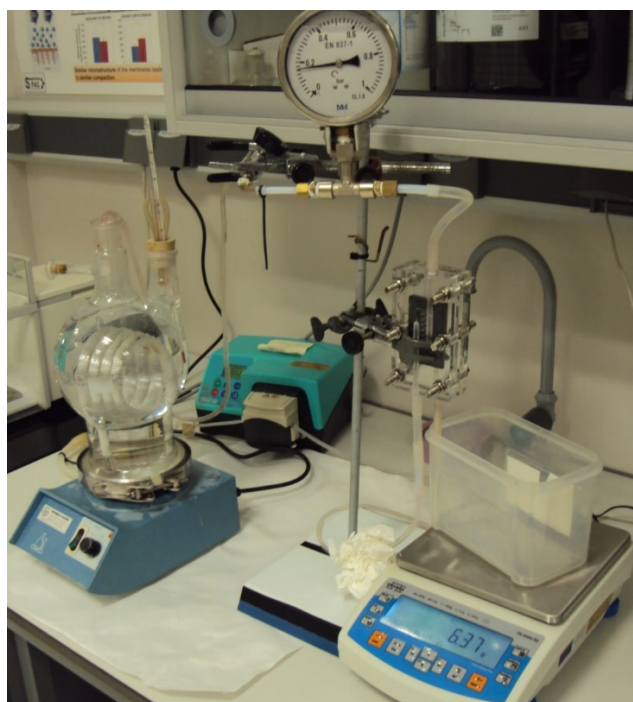


Figura 4. Sistema experimental de flujo cruzado

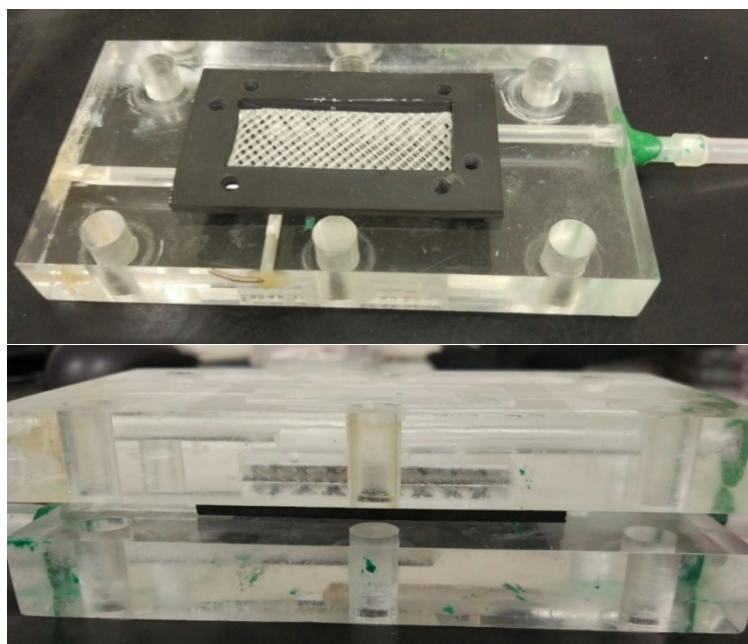


Figura 5. Soporte de la membrana para las pruebas de flujo cruzado

Las mediciones de flujo cruzado de agua UP se realizaron a una temperatura de 37 °C. Los rangos de presión y caudal de alimentación utilizados variaron en función de la membrana analizada tal y como se muestra en la tabla 2, ya que las propiedades mecánicas de las mismas eran distintas.

Tabla 2. Condiciones de operación de las pruebas de flujo cruzado de agua UP

Membrana	Caudal	Rango de Presión
PAN15-UP PAN15-EtOH PAN15-IPA	160 rpm (93 mL/min)	0.04-0.16 bar
Resto de membranas	90 rpm (52 mL/min)	0.04-0.08 bar

Las pruebas de flujo hidráulico cruzado se realizaron durante periodos de tiempo comprendidos entre 3 y 4 horas. En primer lugar se acondicionó la membrana a una presión de 0.08 bar durante aproximadamente 1 h hasta conseguir la estabilización. Una vez estabilizado el flujo, se evaluaron una serie de valores intermedios de presión

durante períodos de aproximadamente 30 min (15 min de estabilización al nuevo valor de presión y otros 15 min de medición).

Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado para cada tipo de membrana. Los resultados fueron presentados a través de la permeancia, calculada como la media de permeancias entre las muestras para cada tipo de membrana, y su correspondiente desviación estándar ($\pm$).

Los valores de permeancia (K_w , $L/h \cdot m^2 \cdot bar$) se obtuvieron a partir de la ecuación 2, siendo J_w el flujo de agua obtenido ($L/h \cdot m^2$) y ΔP la presión utilizada (bar).

$$J_w = K_w \cdot \Delta P \quad (2)$$

El valor de la permeancia se obtuvo de la representación de la masa de permeado acumulada frente al tiempo obteniéndose una recta cuya pendiente es la permeancia hidráulica de la membrana.

Con el flujo determinado a cada intervalo de presión estudiado se obtuvo una representación gráfica como la mostrada en la figura 6. La pendiente obtenida se correspondió con la permeancia de la membrana.

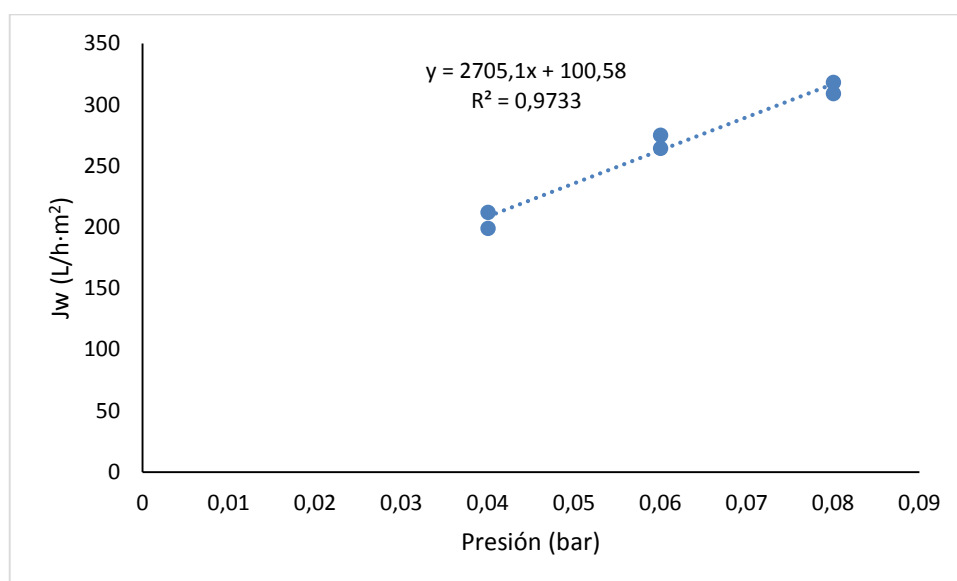


Figura 6. Representación de flujo frente a la presión para obtener la permeancia

1.1.1.2. Análisis del aspecto, espesor y capacidad higroscópica de la membrana polimérica

En el aspecto de la membrana se evaluó principalmente y de forma cualitativa la transparencia a partir de fotografías de las diferentes membranas fabricadas. Además, a partir de estas fotografías, fue posible analizar la influencia del baño de coagulación utilizado y cómo afecta la adición de GO a la opacidad.

El espesor de la membrana δ se midió con un micrómetro electrónico (modelo Standard, Mitutoyo) con un rango de medida entre 0 y 25 mm y un error medio de 0.001 mm.

Con el fin de evaluar la capacidad higroscópica de las distintas membranas con las que se trabajó, se llevaron a cabo pesajes de muestras de membrana en húmedo y en seco.

La higroscopía fue evaluada de acuerdo a la relación teórica propuesta por Alsahy et al [27] adaptándola al caso de estudio, mostrada en la ecuación 1.

$$\varepsilon_w(\%) = \frac{(W_1 - W_2)/\rho_w}{(W_1 - W_2)/\rho_w + W_2/\rho_p} \cdot 100 \quad (1)$$

Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado para cada tipo de membrana. Los resultados fueron presentados a través del cálculo de la media de capacidades higroscópicas entre las muestras para cada tipo de membrana, y su correspondiente desviación estándar ($\pm$).

1.1.1.3. Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de conocer la estructura molecular (enlaces) de la membrana, se llevaron a cabo análisis de espectroscopía para las membranas PAN10-NMP10, PAN10-NMP10-Q, PAN10/GO-NMP10 y PAN10/GO-NMP10-Q mediante la técnica de Fourier Transform

Infrared (FTIR) (Spectrum 65 spectrometer, Perkin Elmer, Spain) con un accesorio ATR (Reflexión Total Atenuada) para muestras sólidas (GladiATR, PIKE Technologies, USA). En el caso de las membranas de PAN10/GO-NMP10 y PAN10/GO-NMP10-Q, las pruebas se realizaron en ambas caras de la muestra con el fin de comprobar la existencia de diferencias en su composición molecular.

1.1.1.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de las membranas fue llevado a cabo en una termobalanza DTG-60H (Shimadzu, Germany) en atmosfera de Nitrógeno. Se trabajó desde temperatura ambiente hasta 800 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La masa utilizada en cada muestra fue de 1-5 mg [28, 29].

1.1.1.5. Análisis de la Voltametría

Las pruebas de voltametría se llevaron a cabo en un Potenciostato/Galvanostato (AUTOLAB, PGSTAT12) con el fin de medir la conductividad de las membranas en húmedo. Las pruebas se realizaron a partir de 2 ciclos estableciendo el valor mínimo de voltaje en -2.5 V y el máximo en 2.5 V, con una velocidad 10 mV/s [12]. Las membranas fueron sumergidas en una solución tampón fosfato salino (PBS) durante 1 día antes de realizar la prueba.

La resistividad fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{V \cdot A}{I \cdot d} \quad ; \quad C = 1/\rho$$

Dónde:

- ρ = Resistividad [$\Omega \cdot \text{cm}$]
- V = Voltaje [V]
- I = Intensidad [A]

- A = Área [cm^2]
- d = Distancia entre electrodos [cm]
- C = Conductividad [S/cm]

A varía en función de la muestra a utilizar al igual que d .

Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado para cada tipo de membrana. Los resultados fueron presentados a través de la conductividad, calculada como la media de conductividades de tres muestras para cada tipo de membrana, y su desviación estándar ($\pm$).

3. Resultados y Discusión

Este trabajo comenzó tomando como referencia resultados y conclusiones obtenidas anteriormente por estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación [30]. En estos estudios se evaluó la viabilidad de membranas de PAN fabricadas mediante la técnica de inversión de fases para su aplicación en proliferación y diferenciación de células madre neuronales. En aquel trabajo se llevó a cabo el análisis de membranas con una concentración de polímero del 10 % w/w y se evaluó la influencia del baño de coagulación utilizado fabricando membranas en distintos baños (UP, EtOH e IPA).

Tomando estos parámetros como base del estudio, el presente trabajo pretende determinar, en primer lugar, la influencia de la concentración de PAN en la disolución polimérica. Para ello, se comenzó por fabricar membranas con una concentración de PAN del 15 % w/w.

De forma similar al trabajo de Juveneton [30], se fabricaron membranas en diferentes baños de coagulación de agua, etanol e isopropanol (PAN15-UP, PAN15-EtOH y PAN15-IPA). En base a los resultados de higroscopía y permeancia que se mostrarán a continuación se hizo la toma de decisión de las mejores condiciones de concentración polimérica y baño de coagulación para la posterior funcionalización de las membranas de PAN con GO.

3.1. Transporte de flujo

La figura 7 muestra la comparativa de las medias de permeancia entre las membranas PAN15-UP, PAN15-EtOH y PAN15-IPA.

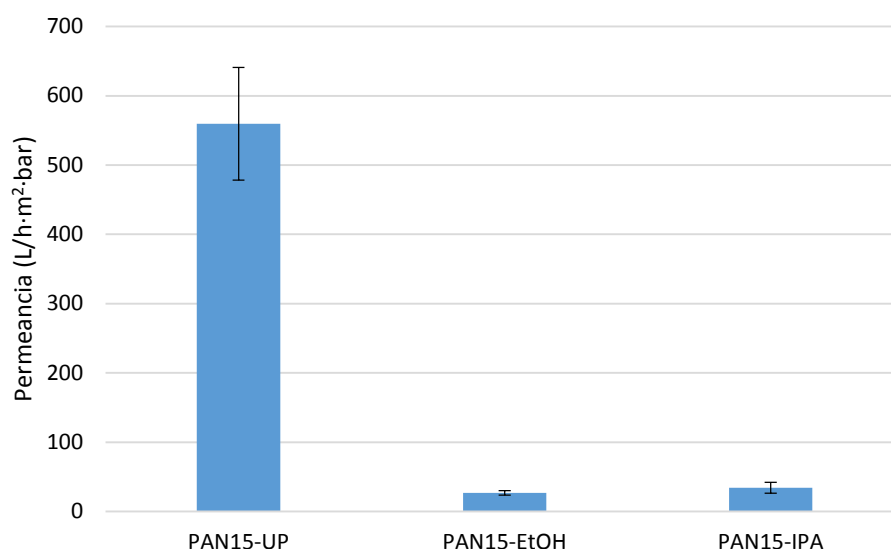


Figura 7. Comparativa de flujo cruzado entre las membranas PAN15-UP, PAN15-EtOH y PAN15-IPA

Las membranas PAN15-EtOH y PAN15-IPA presentaron valores de permeancia muy similares, 27 ± 3 L/h·m²·bar y 34 ± 8 L/h·m²·bar respectivamente. Sin embargo, las membranas PAN15-UP mostraron valores de permeancia mucho mayores (560 ± 81 L/h·m²·bar) debido a la mayor afinidad entre solvente/no solvente UP/NMP, que favorece una mayor porosidad de las membranas. Para una concentración de 10 % de PAN en la disolución, Juveneton [30] reporta valores de permeancia de 225 L/h·m²·bar y 160 L/h·m²·bar para baños de coagulación de EtOH e IPA respectivamente. Por tanto se observa que el aumento de la concentración de PAN en la disolución provoca una disminución en la permeancia de la membrana. Cabe esperar por tanto que membranas de PAN al 10 % fabricadas en baño de coagulación de UP exhiban valores aún mayores de los obtenidos por las muestras de PAN15-UP. Por este motivo, se seleccionó UP como baño de coagulación para la preparación de membranas con GO.

Una vez seleccionado el baño de coagulación de UP y fijada la concentración de PAN en un 10 % w/w, continuando con el análisis llevado a cabo para las propiedades de

espesor y porosidad de la membrana, se evalúa la influencia que la presencia de NMP en el baño de coagulación de UP tiene sobre la permeancia de la membrana.

En la figura 8 se muestran las permeancias obtenidas de las membranas fabricadas al 10 w/w% clasificadas en función del porcentaje de NMP presente en el baño de coagulación de UP (PAN10-NMP5 y PAN10-NMP10), así como la membrana que contiene GO (PAN10/GO-NMP10).

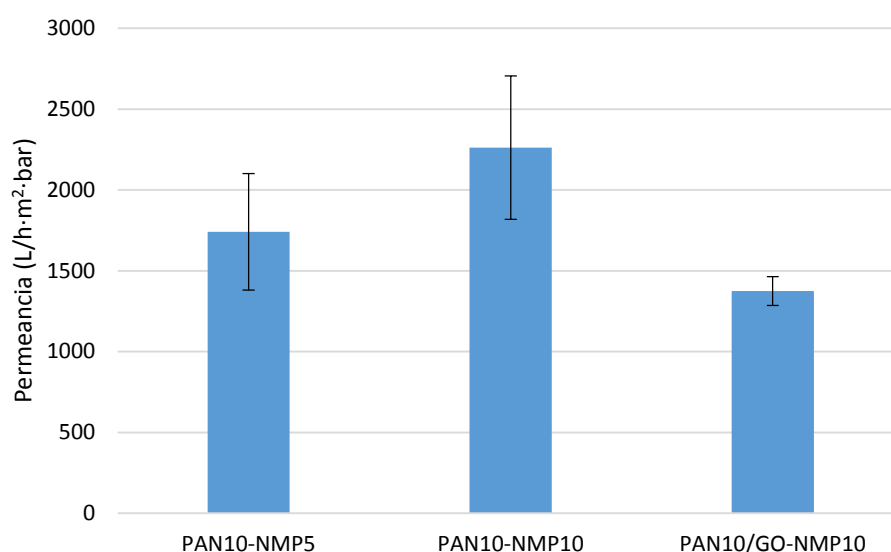


Figura 8. Comparativa de flujo cruzado entre las membranas PAN10-NMP5, PAN10-NMP10 y PAN10/GO-NMP10

A la vista de los resultados, la disminución de la concentración de PAN utilizado en las membranas (10%w/w) y la adición de NMP en el baño de coagulación provocaron un importante aumento en los valores de permeancia mostrados por las membranas en las pruebas, obteniendo valores de permeancia de 1740 ± 360 L/bar·m²·h para las membranas PAN10-NMP5 y de 2260 ± 440 L/bar·m²·h para las membranas PAN10-NMP10, en comparación con los 560 ± 81 L/h·m²·bar de las PAN15-NMP. Como se puede apreciar en la figura 8, el incremento en la concentración de NMP en el baño de coagulación muestra valores mayores de permeancia asociados posiblemente a un aumento en la porosidad de la capa superficial de la membrana [2, 13]. Debido a la mayor permeancia obtenida en las membranas PAN-NMP10, estas fueron las elegidas para la adición de GO 1% w/w. Además, muestras de estas membranas fueron tratadas

térmicamente (PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10-Q) con el fin de crear composites [31]. Sin embargo, las pruebas no se pudieron llevar a cabo para las membranas curadas puesto que su rigidez y fragilidad lo impedían.

Por otra parte, las membranas PAN10/GO-NMP10 con valores de 1375 ± 89 L/bar·m²·h presentaron una disminución significativa respecto de las PAN10-NMP10. Aunque se haya registrado un ligero aumento en la capacidad higroscópica, es posible que este comportamiento esté asociado a la reducción en la porosidad exhibida por las membranas cuando se añade GO en su composición [23].

En comparación con trabajos anteriores acerca del estudio de membranas de aplicación en ingeniería tisular en biorreactores, las membranas de PAN y PAN/GO presentan valores de permeancia hidráulica menores. Como ejemplo, Diban et al [23] presentan membranas de PCL, PCL/GO y PCL/rGO con permeancias hidráulicas de 14437 ± 1860 L/h·m²·bar, 4685 ± 1860 L/h·m²·bar y 36189 ± 4789 L/h·m²·bar respectivamente. Sin embargo, son de un orden de magnitud similar a las reportadas por Bettahalli et al [32]. Para membranas de PLLA con permeancias de 2094 L/h·m²·bar, membranas comerciales de PS y PES con permeancia de 5200 L/h·m²·bar y membranas comerciales de PP cuya permeancia era de 3010 L/h·m²·bar.

Pese a haberse registrado valores de permeancia menores a los anteriormente citados, cabe señalar que el objetivo final del análisis del flujo cruzado en las membranas es mostrar cual sería el comportamiento de las mismas ante el flujo de los nutrientes necesarios para el crecimiento del cultivo celular y, en este sentido, estudios señalan una permeancia de medio de cultivo de 250 L/h·m²·bar como capaz para proveer suficiente glucosa para garantizar la supervivencia de 3 capas celulares en el biorreactor [32]. Por tanto, para complementar estos resultados se recomendaría llevar a cabo estudios de permeancia de medio de cultivo en las membranas preparadas.

3.2. Análisis del aspecto, espesor y capacidad higroscópica de la membrana

El grado de transparencia puede ser un factor de importancia a la hora de evaluar mediante métodos ópticos la evolución del cultivo celular en las membranas (adhesión, proliferación y diferenciación del tejido celular) introducidas en el biorreactor.

En la figura 9 se muestra una foto representativa de las membranas fabricadas PAN15-UP, PAN15-EtOH PAN15-IPA, PAN10-NMP5, PAN10-NMP10 y PAN10/GO-NMP10. Se puede apreciar cómo las membranas coaguladas en baños de EtOH e IPA presentaron un grado de transparencia similar y mayor al de aquellas coaguladas en baño de UP.

La presencia de NMP en el baño de coagulación dio a las membranas una transparencia menor respecto al uso de únicamente UP como baño de coagulación, aunque la diferencia de concentración de NMP en el baño de coagulación utilizada (5% o 10%) no afectó de forma relevante a la transparencia de la membrana. Por otro lado, la adición de GO otorgó a la membrana un tono negro como era de esperar.



Figura 9. Imágenes de las membranas fabricadas con diferentes concentraciones de polímero y baños de coagulación

Las mediciones de viscosidad dieron un valor de 11918 cP. El valor reportado por Juveneton [30] para una disolución con una concentración de PAN al 10 % w/w fue de en torno a 3600 cP.

Si se centra el foco en la influencia del baño de coagulación, a la vista de los resultados reportados de las pruebas SEM por Juveneton [30], la porosidad y espesor es mucho mayor en membranas fabricadas en baño de coagulación de UP que en aquellas fabricadas en baños de EtOH e IPA coincidiendo con los resultados presentados en este estudio (Tabla 3). Además, como resultaba esperable, se reportan considerables diferencias en la transparencia de las membranas siendo mucho mayor para las membranas coaguladas en EtOH e IPA tal y como ocurre en el presente estudio (Figura 9)

En la tabla 3 se muestran los resultados del espesor e higroscopía obtenidos de las distintas membranas fabricadas:

Tabla 3. Espesor e higroscopía de las membranas analizadas a lo largo del estudio

Membrana	Espesor (μm)	Higroscopía (%)
PAN15-UP	198 ± 2	86.8 ± 0.1
PAN15-EtOH	133 ± 13	73.9 ± 1.1
PAN15-IPA	113 ± 20	77.8 ± 2.5
PAN10-NMP5	231 ± 6	94.5 ± 0.2
PAN10-NMP10	215 ± 13	86.5 ± 0.1
PAN10-NMP10-Q	-	93.9 ± 1.7
PAN10/GO-NMP10	144 ± 1	88.9 ± 3.2
PAN10/GO-NMP10-Q	-	85.9 ± 4.3

El grado de transparencia de la membrana parece estar ligado al espesor y la densidad de la misma (Tabla 3). Cuanto menor es el espesor de la membrana, se ha observado mayor grado de transparencia y viceversa. Esto se debe a que los poros en el interior de la membrana provocan la aparición de diferentes ángulos de reflexión de la luz [30]. Debido a ello, el aumento en la densidad de la membrana disminuye la porosidad y la desposee de la superficie necesaria para que se den esos distintos ángulos de

reflexión. Como consecuencia, se espera que las disoluciones más viscosas, cuyo fenómeno de compactación en el baño de coagulación es menos acusado, den lugar a membranas menos densas con un mayor grado de transparencia [30]. Se deduce por tanto, que aquellas membranas poco porosas y con un espesor menor al esperado presenten una mayor transparencia que las más porosas.

Atendiendo a las mediciones de espesor de las membranas PAN15, se aprecian diferencias siendo las membranas de UP las que más se acercaron al valor esperado (200 μm) mientras que las de EtOH e IPA presentaron valores menores. Este comportamiento puede deberse al colapso de la estructura porosa durante la precipitación del polímero en el proceso de fabricación [13]. En este sentido, el texto de referencia reporta un fenómeno similar que parece verse impulsado conforme se disminuye la viscosidad de la disolución, y por ende, conforme disminuye la concentración de PAN. Por ejemplo, en membranas de PAN al 10 % w/w fabricadas en baño de coagulación de IPA, se reportan espesores de $93 \pm 7 \mu\text{m}$ similares a los 113 ± 20 para membranas al 15 % w/w de PAN del presente estudio. Este pequeño incremento puede ser asociado al aumento en la concentración de polímero pero no aporta la evidencia necesaria para confirmar la hipótesis planteada.

En lo que se refiere a la influencia de la adición de NMP al baño de coagulación, se advierte un incremento del espesor que se atribuye al aumento en la porosidad de la capa superficial de las membranas por la presencia de NMP [2], lo que además ayudaría a explicar los resultados de transparencia obtenidos. Sin embargo, no parece que haya una relación proporcional entre la concentración del NMP en el baño de coagulación y el espesor de la membrana.

La introducción del GO en la matriz de la membrana provoca una disminución en el espesor de la misma. Suponemos que esta variación en el espesor es fruto de la compresión de la estructura porosa durante la precipitación del polímero. Cabe mencionar que no hay datos de espesor de las membranas curadas debido a que la alta fragilidad que presentaban, imposibilitó su manipulación para realizar este análisis.

Cuando se emplea el método de inversión de fases, se debe tener en cuenta la influencia del tiempo de coagulación en la morfología final que presenta la membrana.

Existen dos casos que conducen a diferentes tipos de morfología en las membranas, en ambos casos determinados por la separación líquido-líquido. El primer caso se da cuando el proceso es lento dando como resultado membranas densas. El segundo caso, casi instantáneo, da como resultado membranas porosas [33] caracterizadas normalmente por poros tipo “dedo” (fingerlike) y una capa densa selectiva muy fina en la superficie.

En relación a la higroscopía de las membranas, la disminución en la concentración de polímero en la disolución aumenta la higroscopía de forma general. En cuanto al uso de los distintos baños de coagulación, se observa que el uso de EtOH y el IPA hacen disminuir ligeramente la capacidad higroscópica de las membranas. Esto se debe a que el proceso de inversión de fases entre UP/NMP es más rápido y conlleva la formación de macroporos, mientras que la afinidad entre EtOH/NMP e IPA/NMP es menor provocando la formación de poros de menor tamaño que dan como resultado una membrana más densa, lo que afecta a su capacidad higroscópica [13].

La introducción de GO a la matriz no afectó significativamente a la higroscopía de la membrana.

3.3. Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de espectroscopía se llevó a cabo mediante la técnica FTIR con el fin de conocer la estructura molecular de las diferentes membranas fabricadas. Los perfiles obtenidos para las muestras de PAN10-NMP10, PAN10/GO-NMP10, PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10-Q se presentan en la figura 10.

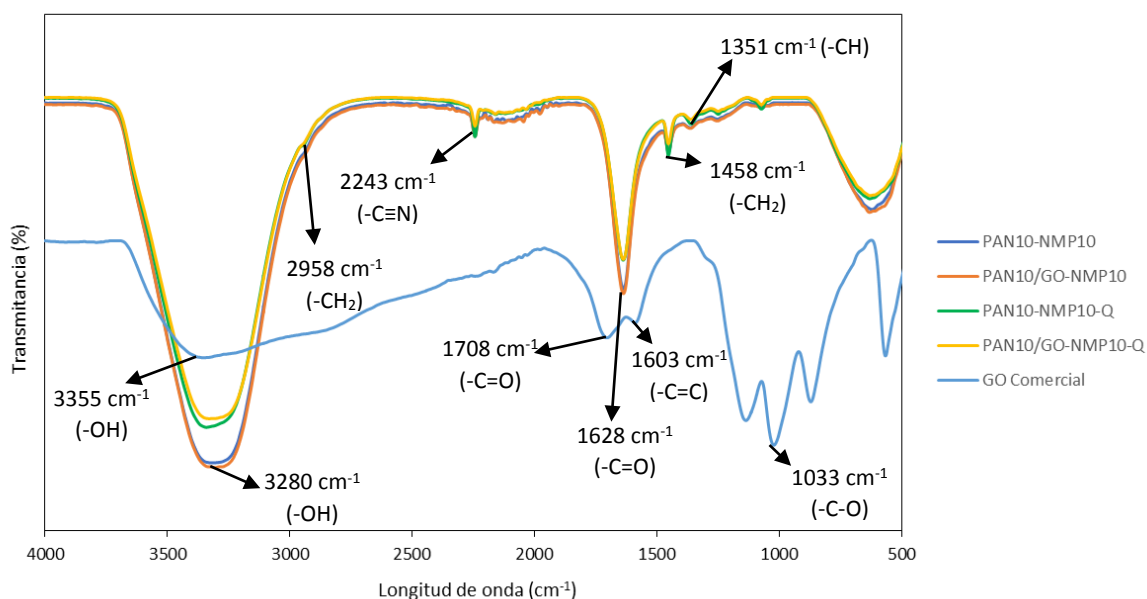


Figura 10. Espectro FTIR de las membranas PAN10-NMP10, PAN10/GO-NMP10, PAN10-NMP10-Q, PAN10/GO-NMP10-Q y perfil del GO comercial

Antes del curado, los perfiles obtenidos para todas las membranas de PAN mostraron picos característicos en 3280 cm^{-1} correspondiente a los grupos hidroxilo (-OH), provenientes de los restos de agua en la muestra [34, 35], en 2958 cm^{-1} asociado a grupos metilo (-CH₂) [31], en 2243 cm^{-1} atribuido a los grupos nitrilo (-C≡N) [29, 31, 34, 35, 36, 37], en 1628 cm^{-1} correspondiente a grupos nitrilo conjugados (-C=N) [31, 38], en 1458 cm^{-1} asociado a un grupo metilo (-CH₂) [31, 34, 37, 38] y en 1351 cm^{-1} (-CH) [31].

En los perfiles correspondientes a las membranas curadas, la intensidad de los picos en 3280 cm^{-1} y 1628 cm^{-1} disminuye y es atribuible a la pérdida por ciclización y deshidrogenación del PAN y a la transformación de las cadenas poliméricas principales del PAN en una red ciclizada [31].

El perfil de espectroscopia del Oxido de Grafeno (GO) mostró el primer pico en 3355 cm^{-1} correspondiente a los grupos hidroxilo (-OH) [14, 39]. Los picos registrados en 1708 y 1033 cm^{-1} son atribuidos a grupos carboxilo (-C=O) y alkoxi (-C-O) respectivamente [40]. El pico registrado en 1603 cm^{-1} puede ser atribuido al enlace sp^2 del grupo (-C=C) [39].

Las curvas correspondientes a las membranas PAN10-NMP10 y PAN10/GO-NMP10 son bastante similares y no se presentan nuevos picos característicos del GO. La concentración de GO en la disolución polimérica no era lo suficientemente alta para cambiar la estructura química del PAN y no se formó ningún enlace químico entre las cadenas de PAN y el GO, tal y como reportan Wang et al [18] para una concentración de GO del 0.5 %.

3.4. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica de las membranas, se llevó a cabo un análisis termogravimétrico de las membranas PAN10-NMP10, PAN10/GO-NMP10, PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10-Q cuyos resultados se muestran en la figura 11 a partir de una muestra representativa de cada una de las membranas estudiadas.

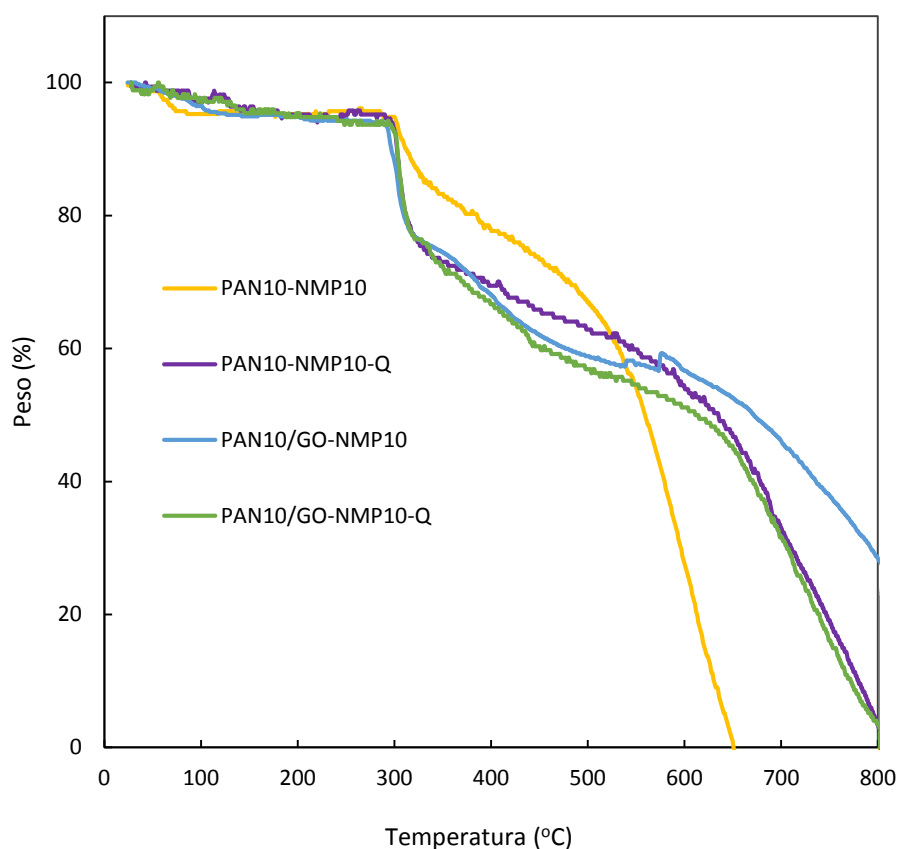


Figura 11. Análisis termogravimétrico de las membranas PAN10-NMP10, PAN10-NMP10-Q, PAN10/GO-NMP10 y PAN10/GO-NMP10-Q

La figura 11 muestra cómo el incremento de la temperatura provoca una pérdida de peso en las membranas. La pequeña pérdida de peso que las membranas experimentan en la región de bajas temperaturas (0-200 °C) es debida a la evaporación del disolvente residual [24] y a reacciones de ciclización con formación de anillos aromáticos aproximadamente a 200 °C [38]. Cuando la temperatura alcanza los 300 °C, las membranas presentan una pérdida porcentual de peso significativa, atribuida a la liberación de gases nitrogenados como NH_3 y HCN [38] y causada principalmente por el desarrollo de reacciones de deshidrogenación y de entrecruzamiento de enlaces o reticulación de los grupos nitrilo [29, 41]. La rapidez en esta pérdida a los 300 °C se debe principalmente al efecto de las reacciones de deshidrogenación [42]. Sin embargo el proceso descrito prosigue hasta los 550-600 °C.

La segunda caída importante en el peso se produce a los 490 °C para las membranas PAN10-NMP10 mientras que para la muestra de PAN10/GO-NMP10 la caída ocurre a 630 °C, para PAN10-NMP10-Q a 620 °C y para la muestra de PAN10/GO-NMP10-Q a 600 °C. Esta caída se debe a la fragmentación de cadenas poliméricas de las fibras de PAN y la consecuente liberación de especies volátiles que provocan la sustancial pérdida de peso [38, 42].

Como se puede comprobar a través del análisis realizado, aunque la estabilidad térmica de las muestras de PAN10/GO-NMP10 es menor en el rango de temperaturas en el que se produce la pérdida de los grupos nitrogenados, posteriormente presenta una notable mejora en la estabilidad de la estructura polimérica respecto de las muestras de PAN10-NMP10. Este incremento puede deberse a la dispersión uniforme del Óxido de Grafeno en la membrana y a su fuerte interacción con el PAN [24].

La comparación entre PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10-Q no muestra diferencias significativas ya que exhiben un perfil similar en sus curvas asemejándose tanto en la pérdida en el porcentaje de peso como el intervalo de temperaturas en el que sucede dicha pérdida. Esto concuerda con los resultados obtenidos del análisis FTIR de las membranas en las que no se observan diferencias químicas entre las membranas curadas y sin curar. Por tanto, el proceso de curado de estas membranas no muestra una mejora en la estabilidad térmica como sería esperable gracias a la pirolisis de los débiles grupos funcionales oxigenados asociada al curado [43].

3.5. Análisis de la Voltametría

En la figura 12 se exponen los resultados de las conductividades obtenidas a partir del análisis de voltametría llevado a cabo para las membranas de PAN10-NMP10, PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10. Las membranas PAN10/GO-NMP10-Q no pudieron ser incluidas en el análisis ya que, en el momento de realizar las pruebas, la fragilidad de las muestras hacía imposible su manipulación impidiendo realizar las mediciones correspondientes.

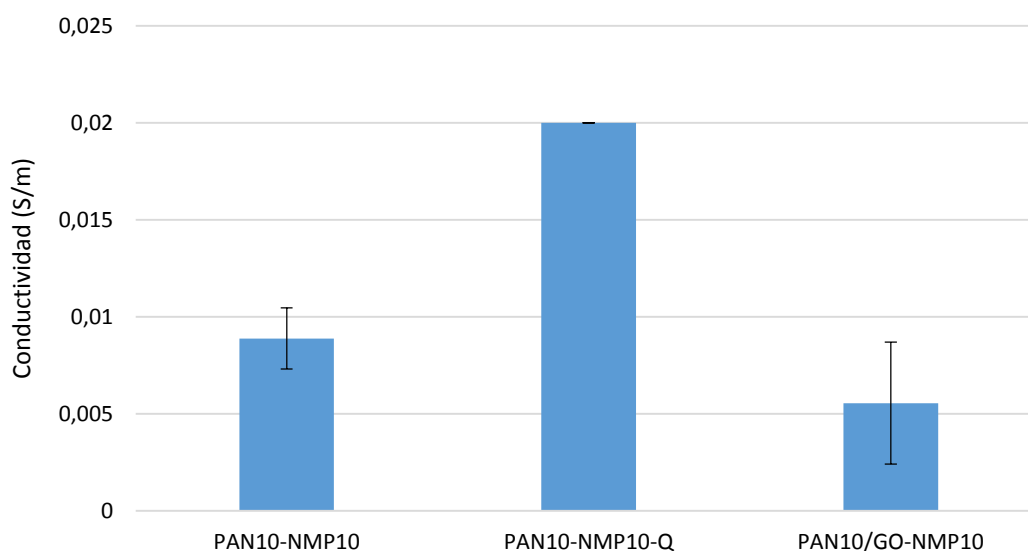


Figura 12. Comparativa de conductividad para las membranas PAN10-NMP10, PAN10-NMP10-Q y PAN10/GO-NMP10

A la vista de los resultados obtenidos, se observa que la conductividad es menor en las membranas de PAN10-NMP10 que en sus homónimas curadas.

De igual manera se observa cómo, la conductividad media de las membranas PAN10/GO-NMP10 es ligeramente menor, aunque no estadísticamente significativa, que la de las membranas PAN10-NMP10. Esta diferencia se atribuye a la adición de GO y su naturaleza no conductora. La similitud en las conductividades para estas dos membranas puede considerarse esperable si se contempla la posibilidad de que la concentración de GO en la estructura polimérica no haya alcanzado el umbral de

percolación del GO que Rotman et al [44] establecen entre el 1% y el 2 % para el PTC concordando además con los resultados obtenidos del análisis de espectroscopía FTIR en el que no se observan picos característicos del GO en las muestras de PAN10/GO-NMP10 y PAN10/GO-NMP10-Q.

En lo que se refiere a las muestras curadas, pese a que el proceso tenía como objetivo lograr la reducción del GO y la formación de composites, resultó impracticable la manipulación de las muestras para llevar a cabo las mediciones, ya que a causa del tratamiento térmico [31].

Cabe señalar que, aunque no se han observado mejoras en las propiedades de conducción por parte de las membranas con GO, sí que es conocida la positiva influencia que la adición de GO en la composición de la membrana tiene sobre la proliferación de células de tipo neuronal y sus características morfológicas [23]. Además la adición en las “scaffolds” de grafeno y compuestos derivados promueve la diferenciación de las células madre en células neuronales.

4. Conclusiones y futuros trabajos

El presente estudio se ha centrado en la fabricación y caracterización de membranas de Poliacrilonitrilo (PAN) poniendo el foco en aquellas propiedades que son clave para determinar si estas son aptas para su aplicación en Ingeniería Tisular. Con el fin de mejorar dichas propiedades, se introdujeron en su composición nanopartículas de Óxido de Grafeno (GO, 1 % w/w)). Previo a llevar a cabo la funcionalización de las membranas se valoró la influencia de: la concentración de PAN en la disolución polimérica (10 % y 15 %), el uso de distintos baños de coagulación (UP, EtOH, IPA), la presencia de disolvente (NMP) en el baño de coagulación (5 % y 10 %). Las membranas tanto sin funcionalizar como funcionalizadas con GO se han caracterizado conforme a una serie de técnicas analíticas (espesor, capacidad higroscópica, permeancia hidráulica, estabilidad térmica, estructura molecular, conductividad eléctrica).

Los resultados mostraron que las propiedades de transporte de fluidos, dependen de una forma muy importante de la concentración de polímero y del baño de coagulación escogidos. Los resultados de flujo hidráulico cruzado condujeron a la selección de una concentración de PAN del 10 % w/w. En lo referente a los baños de coagulación considerados, destacó el baño en UP (560 L/h·m²·bar) sobre los de EtOH (27 L/h·m²·bar) e IPA (34 L/h·m²·bar). La inclusión de disolvente (NMP) en el baño de coagulación produjo un aumento de la permeancia probablemente asociado al aumento de la porosidad en la capa más superficial de la misma, por ejemplo, introducir un 10%v/v de NMP en el baño de coagulación de agua UP incrementó la permeancia hidráulica hasta 2260 L/h·m²·bar.

En lo referente a la influencia del Óxido de Grafeno en las propiedades de la membrana, se ha concluido que, pese a que la adición de GO a la composición de las membranas conduce a menores registros de permeancia hidráulica (1375 L/h·m²·bar), estos se mantienen en valores suficientes para suministrar el flujo efectivo de nutrientes en el biorreactor.

El análisis FTIR de las muestras no mostró diferencias significativas en la estructura molecular. Todas ellas presentaban los mismos picos característicos sin que se observasen picos característicos de la presencia de GO o rGO aunque si se observaron diferencias en la intensidad de algunos picos atribuibles a reacciones complejas (ciclización y deshidrogenación). Sin embargo, los resultados obtenidos del análisis termogravimétrico (TGA) mostraron una mejora en la estabilidad térmica de la estructura polimérica en aquellas muestras que contenían GO. Por otro lado, las muestras sometidas al proceso de curado no mostraron mejoras en la estabilidad térmica.

Los análisis de voltametría mostraron una conductividad ligeramente menor, aunque no significativa, para las membranas con GO frente a las que no contenían GO. Estos resultados sugieren que no se ha alcanzado el umbral de percolación del GO en el PAN. La conductividad obtenida en las muestras curadas fue mayor para aquellas que no contenían GO. Sin embargo, del análisis de las muestras que contenían GO no se llegaron a obtener resultados debido a la rigidez y fragilidad que adquirieron tras el curado. Esto impidió su manipulación y la realización de las pruebas.

En el presente estudio, las propiedades mecánicas de la membrana han supuesto una limitación muy importante a la hora de realizar los ensayos pertinentes en cada caso. El carácter endeble de las membranas tras su fabricación obligó a reducir el caudal y el rango de presiones a los que se llevaron a cabo las pruebas de flujo hidráulico cruzado. Por otro lado, el curado dotó a las membranas de una rigidez que hacía extremadamente dificultosa su manipulación sin causar su rotura. Por ello se recomienda que en próximos trabajos se investigue en métodos para la mejora de las propiedades mecánicas de la membrana que logren salvar dichas limitaciones.

Por otro lado, se propone para futuros trabajos, el estudio del aumento de la concentración de GO en la disolución polimérica alcanzar el valor límite de percolación eléctrica y la sustitución de GO por Grafeno con el fin de mejorar las propiedades conductoras de la membrana.

En este sentido se propone además, que en futuros trabajos se evalúe el efecto de la presencia de GO en las membranas sobre la proliferación y diferenciación celular.

Por último, también se sugiere continuar con el estudio de las propiedades de transporte de flujo de las membranas evaluando el comportamiento de las mismas ante el flujo de nutrientes.

5. Referencias

- [1] DIBAN, N. [et al.] 2014. Poly(ϵ -caprolactone) Films with Favourable Properties for Neural Cell Growth. *Current Topics in Medicinal Chemistry* (14), pp. 2743-2749
- [2] MORELLI, S. [et al.] 2012. Flat and tubular membrane systems for the reconstruction of hippocampal neuronal network. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (6), pp. 299-313
- [3] STAMATIALIS, D. [et al.] 2007. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of membrane science* (308), pp. 1-34
- [4] D.BARRIO, L. 2016. *Estudio de la utilización de agentes preservantes durante la fabricación de membranas de poli(ϵ -caprolactona) en sus propiedades de transporte de nutrientes en biorreactores para ingeniería tisular*. N. Diban. Trabajo de Fin de Grado, ETSIIT Universidad de Cantabria
- [5] ROMAY, M. 2016. *Estudio de la degradabilidad in vitro de nuevas membranas de poli (ϵ -caprolactona) funcionalizadas con grafeno para regeneración de tejido neuronal*. N. Diban. Trabajo de Fin de Grado, ETSIIT Universidad de Cantabria
- [6] MARTIN, Y.; VERMETTE, P. 2005. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, (26), pp. 7481-7503
- [7] EISENBARTH, E. 2007. Biomaterials for tissue engineering. *Advanced Engineering Materials* (12), pp. 1051-1060
- [8] VERT, M. 2007. Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. *Progress in Polymer Science* (32), pp. 755-761
- [9] MA, P. 2008. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* (60), pp. 184-198
- [10] DE BARTOLO, L. [et al] 2006. Human galactosylated membrane bioreactor for the long-term maintenance of liver specific functions. *Desalination* (199), pp. 147-149
- [11] DE BARTOLO, L. [et al] 2006. Hepatocellular functions of human liver cells in oxygen-permeable membrane device. *Desalination* (200), pp. 488-490
- [12] STEWART, E. [et al.] 2015. Electrical stimulation using conductive polymer polypyrrole promotes differentiation of human neural cells: A biocompatible

platform for translational neural tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*

- [13] DIBAN, N; STAMATIALIS, D. 2011. Functional Polymer Scaffolds for Blood Vessel Tissue Engineering. *Macromolecular Symposia* (309-310), pp. 93-99
- [14] WANG, Q. [et al.] 2012. Nanostructures and surface nanochemical properties of Polyacrylonitrile/Graphene Oxide composite nanofibers by electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* (128), pp. 1152-157
- [15] DE BARTOLO, L. [et al] 2008. Influence of membrane Surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. *Journal of Membrane Science* (325), pp. 139-149
- [16] BRAMINI, M. [et al] 2016. Graphene oxide nanosheets disrupt lipid composition, Ca²⁺ Homeostasis, and synaptic transmission in primary cortical neurons. *ACS Nano* (10), pp. 7154-7171
- [17] CHEN, H. [et al] 2017. Graphene oxide dysregulates neuroligin/NLG-1-mediated molecular signaling in interneurons in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific reports*
- [18] SARAIVANAN, S. [et al] 2017. Scaffolds containing chitosan, gelatin and graphene oxide for bone tissue regeneration *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Biological Macromolecules* (104), pp. 1975-1985
- [19] JUNGHYUN, K; MICHAEL, J. 2017. Neutron-activatable radionuclide cancer therapy using graphene oxide nanoplatelets. *Nuclear Medicine and Biology* (52), pp. 42-48
- [20] MOATAZ, D. [et al] 2017. Graphene oxide nanosheets in complex with cell penetrating peptides for oligonucleotides delivery. *BBA-General Subjects* (1861), pp. 2334-2341
- [21] MANZO, L.P. [et al] 2017. Magnetic, but not non-magnetic, reduced graphene oxide in spinal cord increases nociceptive neuronal responsiveness. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (13), pp. 1841-1851
- [22] JILING, Y. [et al] 2016. In vitro biological evaluation of graphene on neuronal cells. *Journal of Wuhan University of Technology-mater.* Vol 31 (4), pp. 925-930
- [23] DIBAN, N; SÁNCHEZ-GONZALEZ, S; LÁZARO-DÍEZ, M; RAMOS-VIVAS, J; URTIAGA, A. 2017. Facile fabrication of poly(ε-caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering. *Journal of Membrane Science* (540), pp. 219-228

- [24] UDDIN, Md. E. [et al.] 2015. Preparation and properties of reduced graphene oxide/polyacrylonitrile nanocomposites using polyvinyl phenol. *Composites Part B* (80), pp. 238-245
- [25] DE BARTOLO, L. [et al.] 2002. Evaluation of cell behaviour related to physico-chemical properties of polymeric membranes to be used in bioartificial organs. *Biomaterials* (23), pp. 2485-2497
- [26] GUO, W. [et al.] 2015. Construction of a 3D rGO-collagen hybrid scaffold for enhancement of the neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Nanoscale*. DOI: 10.1039/C5NR06602F.
- [27] ALSHALY, Q. [et al.] 2013. Preparation and Characterization of Poly(vinyl chloride)/Polystyrene/Poly(ethylene glycol) Hollow-Fiber Ultrafiltration Membranes. *Journal of Applied Polymer Science* (130), pp. 989-1004
- [28] SARIER, N. [et al.] 2016. Production of PEG grafted PAN copolymers and their electrospun nanowebs as novel thermal energy storage materials. *Thermochimica Acta* (643), pp. 83-93
- [29] NIU, Q. [et al.] 2017. Facile fabrication of PAN/PDMS core-shell nanofibers from synchronous photopolymerization. *Materials Science and Engineering C* (77), pp. 326-332
- [30] JUVENETON, C. 2015. *Synthesis and characterization of biocompatible polyacrylonitrile membranes by phase inversion technique for proliferation and differentiation of neural cells*. N. Diban. Trabajo de Fin de Grado, ETSIIT Universidad de Cantabria
- [31] SUNGHO, L. [et al.] 2012. Synthesis and properties of thermally reduced graphene oxide/polyacrylonitrile composites. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* (73), pp. 741-743
- [32] BETTAHALLI, N.M.S. [et al.] 2011. Integration of hollow fiber membranes improves nutrient supply in three-dimensional tissue constructs. *Acta Biomaterialia* (7), pp. 3312-3324
- [33] BULTE, A.M.V. [et al.] 1996. Diffusion induced phase separation with crystallizable nylons. I. Mass transfer processes for nylon 4,6. *Journal of Membrane Science* (121), pp. 37-49

- [34] CHENGWEN, S. [et al.] 2009. Effect of carbonization atmosphere on the structure changes of PAN carbon membranes. *J Porous Mater* (16), pp. 197-203
- [35] WANG, Y; WENYAN, Y. 2011. Chemical modification for PAN fibers during heat-treatment process. *Physics Procedia* (18), pp. 202-205
- [36] MOHAMED, A. [et al.] 2017. Surface functionalized composite nanofibers for efficient removal of arsenic from aqueous solutions. *Chemosphere* (180), pp. 108-116
- [37] PAN, W; ZHANG, Q; CHEN, Y. 2011. Preparation of Polyacrylonitrile and polystyrene blend fibers through electrospinning. *Advanced Materials Research* (332-334), pp. 235-238
- [38] ALARIFI, I.M. [et al.] 2015. Thermal, Electrical and Surface hydrophobic properties of electrospun Polyacrylonitrile nanofibers for structural health monitoring. *MDPI Material* (8), pp. 7017-7031
- [39] SOOKHAKIAN, M. [et al.] 2013. Hierarchically ordered macro-mesoporous ZnS microsphere with reduced graphene oxide supporter for a highly efficient photodegradation of methylene blue. *Applied Surface Science* (283), pp. 668-677
- [40] LIANG, D. [et al.] 2014. One-step hydrothermal synthesis of anatase TiO₂/reduced graphene oxide nanocomposites with enhanced photocatalytic activity. *Journal of Alloys and Compounds* (582), pp. 236-240
- [41] CHAÚQUE, E.F.C. [et al.] 2016. Modification of electrospun polyacrylonitrile with EDTA for the removal of Cd and Cr ions from water effluents. *Applied Surface Science*
- [42] MOAFI, H.F. [et al.] 2011. Semiconductor-Assisted Self-Cleaning Polymeric Fibers Based on Zinc Oxide Nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* (121), pp. 3641-3650
- [43] STANKOVICH, S. [et al.] 2007. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Elsevier Carbon* (45), pp. 1558-1565
- [44] ROTMAN, S.G. [et al] 2016. Preparation and characterization of poly(trimethylene carbonate) and reduced graphene oxide composites for nerve regeneration. *Polymer Advanced Technologies* (28), pp. 1233-1238