

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS  
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



***Trabajo Fin de Grado***

**Membranas composite PCL/grafeno:  
estudio del efecto del grado de oxidación  
de los nanomateriales de grafeno sobre el  
control molecular de la diferenciación  
neuronal**

**PCL/graphene composite membranes: Study  
of the effect of the oxidative state of Graphene  
nanomaterials on the molecular control of the  
neuronal differentiation.**

Para acceder al Título de

***Graduada en Ingeniería Química***

Raquel de la Hoz Ruiz

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quería expresar mi más sincera gratitud a mi directora del presente Trabajo de Fin de Grado, Nazely Diban Gómez, por su dedicación y ayuda en todos los aspectos del mismo. También quería agradecerle la oportunidad que me brindó al confiar en mí para desarrollar parte de este proyecto dentro del campo de la biología celular, descubriéndome un área de conocimiento nuevo para mí y que me ha servido para ampliar mi formación científica.

También quería mostrar mis más sinceros agradecimientos a todos los miembros que componen el Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Universidad de Cantabria por tratarme desde el primer día como una más y brindarme una formación excepcional. En particular quería agradecer a mi co-directora, Olga Tapia Martínez, por su incondicional ayuda en todos los aspectos de este proyecto.

Por último agradecer a mi familia y amigos el apoyo que me han brindado durante estos cuatro años y medio. Gracias por hacerme reír y disfrutar tanto en los peores momentos.

# Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1. Objetivo. ....	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
2.1. Fabricación de membranas compuestas: PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox. ....	11
2.1.1. Síntesis y procesado del óxido de grafeno (2% y 20% oxígeno). ....	11
2.1.2. Preparación de la disolución polimérica. ....	12
2.1.3. Técnica de inversión de fases mediante el proceso de casting. ....	12
2.2. Características físico-químicas y morfológicas. ....	12
2.2.1. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). ....	13
2.2.2. Determinación de la porosidad mediante análisis gravimétrico. ....	13
2.2.3. Espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). ....	14
2.2.4. Ángulo de contacto. ....	14
2.2.5. Espectroscopia Raman. ....	15
2.3. Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA). ....	16
2.4. Análisis de la conductividad eléctrica de las membranas mediante voltametría. ....	16
2.5. Caracterización del flujo de agua. Permeabilidad hidráulica. ....	17
2.6. Modelo experimental biológico. ....	19
2.6.1 Cultivo de la línea celular C6. ....	19
2.6.2. Método de recuento y subcultivo celular. ....	21
2.6.3. Preparación y esterilización de membranas PCL/OG para el crecimiento celular. ....	21
2.7. Técnica de inmunofluorescencia y Microscopía Confocal. ....	22
2.7.1. Marcaje de los filamentos finos de actina de la corteza celular y del ADN. ....	22
2.7.2. Inmunohistoquímica. ....	23
2.7.2 Microscopía Confocal. ....	24
2.8. Análisis morfométrico y estadístico. ....	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
3.1. Características fisicoquímicas de las membranas compuestas PCL/OG. ....	26
3.2. Caracterización del flujo de agua. Permeabilidad hidráulica. ....	30
3.3. Análisis de las propiedades eléctricas de las membranas compuestas PCL/OG. ....	31

3.4. Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA). .....	32
3.5. Técnicas espectroscópicas FTIR y Raman. ....	36
3.6 Efecto del contenido de oxígeno del OG sobre la diferenciación de células C6 a astrocitos .....	40
4. CONCLUSIONES.....	47
5. ANEXOS.....	49
6. BIBLIOGRAFÍA .....	52

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> El grafeno y óxido de grafeno (OG) usados como soportes para el cultivo de células madre refuerza la proliferación y diferenciación de los diferentes tipos de células madre en tejidos específicos. Modificado del artículo Kernry [et.al.] [45].....	7
<b>Figura 2.</b> Fundamento teórico del proceso de inversión de fases. ....	8
<b>Figura 3.</b> Exfoliación anódica del grafito [14]. ....	11
<b>Figura 4.</b> Criterios de hidrofiliidad/hidrofobicidad [10]. ....	15
<b>Figura 5.</b> Temperaturas características de un TGA. ....	16
<b>Figura 6.</b> Sistema de caracterización del flujo de agua. ....	18
<b>Figura 7.</b> Flujo de permeado frente al incremento de presión. ....	19
<b>Figura 8. a)</b> Imagen SEM de la adhesión celular. <b>b)</b> Modificación química de las cadenas de poliestireno de las placas de Petri. <b>c)</b> Imagen de microscopía óptica de un cultivo de células gliales C6. Escala 100µm.....	20
<b>Figura 9.</b> Esquema del mecanismo de inmunohistoquímica indirecta para la detección de GFAP. ....	23
<b>Figura 10.</b> Imágenes SEM de la superficie y de la sección transversal de las membranas compuestas PCL/OG 2% y PCL/OG 20%. ....	26
<b>Figura 11.</b> Ángulos de contacto de las membranas de <b>(a)</b> PCL/OG 2% de oxígeno y <b>(b)</b> PCL/OG 20% oxígeno. ....	29
<b>Figura 12.</b> Flujos de permeado a diferentes presiones transmembrana y cálculo de la permeancia ( $P_w$ ) mediante la pendiente de la recta. ....	30
<b>Figura 13.</b> Termogramas <b>(a)</b> TGA y <b>(b)</b> DTA de las membranas compuestas PCL/OG 2% Ox, PCL/OG 20% Ox y de PCL <sup>[18]</sup> .....	32
<b>Figura 14.</b> Mecanismo de degradación térmica de los pellets de PCL. Modificada de la referencia [16]. ....	34
<b>Figura 15.</b> Picos característicos de un DTA genérico para la PCL [17]. ....	35
<b>Figura 16.</b> Espectros FTIR para las membranas compuestas de PCL/OG 2% Ox y 20% Ox, así como el espectro de las membranas de PCL citado en la bibliografía [18]. ....	36
<b>Figura 17. (a)</b> Espectro Raman y <b>(b)</b> distribución superficial y <b>(c)</b> en espesor del grafeno en la membrana PCL/OG 2% Ox; así como <b>(d)</b> espectro Raman y <b>(e)</b> distribución superficial y <b>(f)</b> en espesor del OG en la membrana PCL/OG 20% Ox. ....	38

<b>Figura 18.</b> Estudio morfológico de la longitud de las proyecciones.....	40
<b>Figura 19.</b> Estudio morfométrico del área nuclear.....	42
<b>Figura 20.</b> Estudio cuantitativo del número de proyecciones.....	43
<b>Figura 21.</b> Microscopia confocal de células C6 diferenciadas. Análisis de la expresión del marcador molecular de astrocitos (GFAP).....	44
<b>Figura 22.</b> Representación de la proporción de células C6 GFAP-positivas.....	45
<b>Tabla 1.</b> Características fisicoquímicas morfológicas y propiedades eléctricas de las membranas compuestas PCL/OG con 2% y 20% de oxígeno y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL, PCL/OG y PCL/rOG [18].....	29
<b>Tabla 2.</b> Permeancias hidráulicas de las membranas PCL/OG con 2 % y 20% Ox y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL, PCL/OG y PCL/rOG.....	31
<b>Tabla 3.</b> Temperaturas características de un TGA para las membranas compuestas PCL/OG con 2% y 20% de oxígeno y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL, del grafeno y de la PCL en pellets. ....	33
<b>Tabla 4.</b> Picos endotérmicos y exotérmicos de los DTA de membranas compuestas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL y de la PCL en pellets.....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

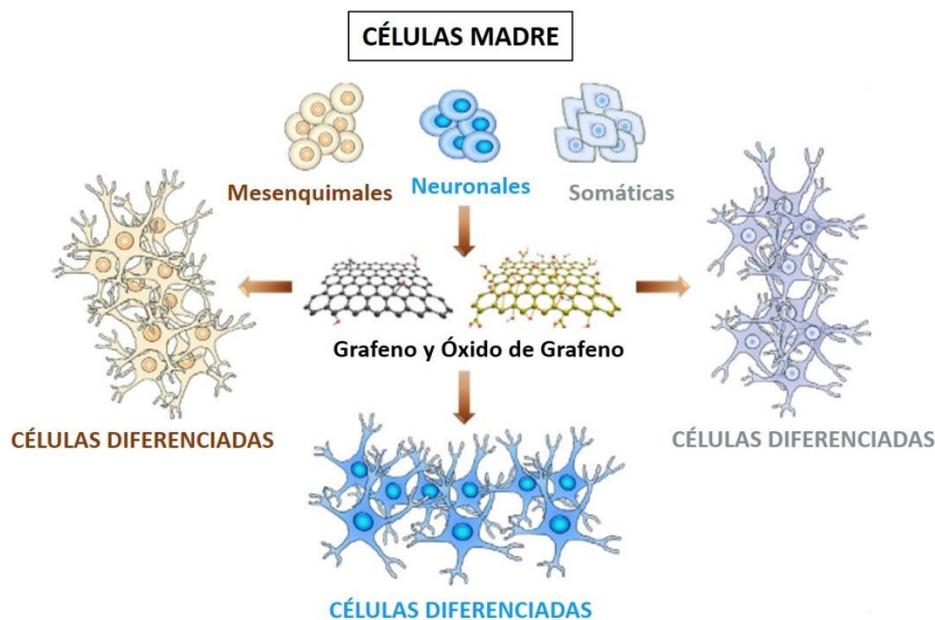
La investigación de enfermedades neuronales a través de cultivos *in vitro* constituye una fuente de conocimiento fundamental para la comprensión de los modelos neuronales, desórdenes neurodegenerativos y una oportunidad para el desarrollo de nuevos fármacos. En los últimos años, la ingeniería de tejidos ha sido una técnica muy utilizada en el campo de la biomedicina y la medicina regenerativa para desarrollar tejidos a partir de cultivos de células *in vitro*. La ingeniería tisular combina conocimientos del campo de la biología celular, la histología y la ingeniería de biomateriales, para ensamblar construcciones funcionales (nuevos tejidos) que restauren, sustituyan o mejoren tejidos dañados u órganos completos a partir de células procedentes de cultivos *in vitro* y biomateriales usados como soporte de los mismos. Actualmente se ha demostrado que el uso de nuevos biomateriales, como polímeros sintéticos, mejora la regeneración de las células neuronales cultivadas *in vitro*. Por ello, se están diseñando sustratos sintéticos que imitan las matrices extracelulares específicas de los tejidos, generando así un soporte estructural para el desarrollo de modelos celulares con aplicación en biomedicina [1], [2].

Las células madre son el único tipo de células capaces de diferenciarse en líneas celulares específicas para la reparación de tejidos y órganos en el cuerpo humano. La fijación, proliferación y diferenciación de estas células hacia linajes celulares específicos depende de multitud de factores físicos, químicos y del entorno, en concreto, de las matrices extracelulares y de las interacciones de las células madre con el sustrato.

Controlar el destino de las células madre se ha convertido en uno de los aspectos más importantes dentro del campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. Por ello la elección de los biomateriales, que actuaran como soporte para su cultivo *in vitro*, es clave para inducir su diferenciación hacia un tipo de tejido específico. En numerosos estudios [3] se ha demostrado que los materiales poliméricos imitan los microambientes fisiológicos de las células madre y contribuyen a la proliferación y diferenciación de las mismas, pero no son capaces de inducir su diferenciación hacia un tejido concreto. Por ello la introducción de la nanotecnología en el campo de la ingeniería de tejidos jugó un papel fundamental, utilizando nanopartículas 0D, nanotubos 1D, nanoláminas 2D y nanoespumas 3D. En concreto, se ha visto que las nanoláminas de nanomateriales

basados en grafeno, como el grafeno y óxido de grafeno (OG) fundamentalmente, usados como soportes celulares (**Figura 1**) fomentan la proliferación y diferenciación de las células madre hacia tejidos neuronales conformando una nueva generación de biomateriales para el control de las células madre en la ingeniería tisular y la medicina regenerativa [3].

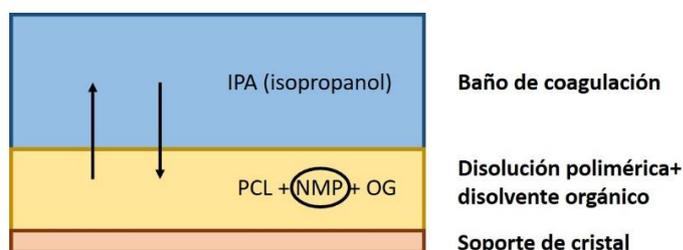
Los nanomateriales basados en grafeno pueden poseer una alta capacidad de conducción eléctrica, y se cree que gracias a esta propiedad, al adaptar estos nanomateriales en soportes para la proliferación neuronal en cultivos *in vitro*, estimulan la electroactividad de estas células e induce su diferenciación hacia neuronas. Esto es debido a que el OG y el grafeno han demostrado su la capacidad de modular los mecanismos de diferenciación de células madre humanas en neuronas y astrocitos [4] y [5]. Sin embargo, su potencial citotoxicidad y su baja biodegradabilidad cuestionan su uso como soportes para cultivos neuronales *in vitro*.



**Figura 1.** El grafeno y óxido de grafeno (OG) usados como soportes para el cultivo de células madre refuerza la proliferación y diferenciación de los diferentes tipos de células madre en tejidos específicos. Modificado del artículo Kernry et.al. [3].

El afán de intentar usar estos nanomateriales como sustrato para cultivos neuronales, ha llevado a los investigadores a desarrollar membranas *composite* formadas por polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables que contienen en su matriz polimérica nanopartículas de grafeno u OG. La mayoría de las técnicas convencionales de fabricación de membranas *composite* implica el uso de elevadas temperaturas, el

empleo de reactivos tóxicos y condiciones experimentales complejas. En numerosos artículos científicos [6] y [7], se ha demostrado que la técnica de inversión de fases para la fabricación de membranas *composite* es la idónea debido a su versatilidad y simplicidad experimental. Las membranas fabricadas mediante esta técnica poseen una alta porosidad e interconectividad entre poros, además de una morfología (microporosa) idónea para la adhesión, proliferación y diferenciación de las células neuronales. Esta técnica consiste en pasar el polímero desde una fase líquida a una fase sólida. El polímero, disuelto en un disolvente orgánico, precipita en un baño de coagulante en el que el polímero no es soluble [8] (**Figura 2**). Esta precipitación se produce porque el disolvente orgánico pasa de la disolución polimérica al baño de coagulación y se mezcla con él.



**Figura 2.** Fundamento teórico del proceso de inversión de fases.

Se emplean biopolímeros sintéticos como sustrato para los cultivos celulares debido a la versatilidad de procesamiento que ofrecen, así como, la adaptabilidad que poseen en relación a sus propiedades mecánicas y la capacidad de imitar las matrices extracelulares de los tejidos del organismo [9]. En concreto, en estudios previos [6] y [2], se ha demostrado que la policaprolactona (PCL) es un polímero biodegradable y citocompatible muy apto para su aplicación en aparatos médicos, y que ayuda a mitigar la potencial citotoxicidad de los nanomateriales basados en grafeno. Además, la PCL ofrece unas propiedades funcionales, de transporte de nutrientes y de adherencia que contribuyen a la creación de un entorno favorable para el crecimiento neuronal.

La incorporación de estos nanomateriales en las membranas *composite* (PCL/grafeno) refuerza las propiedades mecánicas de la matriz polimérica y, como se ha mencionado anteriormente, añade el potencial de las propiedades eléctricas de estos nanomateriales en la membrana. La hipótesis de trabajo es que estas propiedades mejoradas que incorporan los nanomateriales en la membrana inducen una

diferenciación controlada de las células madre neuronales (NSC) ya que estimulan la electroactividad de las mismas y lo convierte en un sustrato idóneo para el cultivo de las mismas [2]. Además de reforzar las propiedades mecánicas y eléctricas, dotan a la matriz polimérica de unas excelentes propiedades de flujo de nutrientes ya que introducen propiedades que evitan el ensuciamiento y la formación de depósitos en la superficie de la membrana (torta) [6].

Otra ventaja de los nanomateriales es su facilidad de modificarse químicamente. De esta forma, la interacción de los soportes biopoliméricos mediante enlaces covalentes o físicos con otras biomoléculas, como la fibronectina (proteína de la matriz extracelular) o los factores de crecimiento, hacen cambiar la hidrofiliidad de la superficie de la membrana o sus interacciones con receptores celulares. Por ello, la incorporación de dichos nanomateriales a la matriz polimérica permite conseguir una funcionalización física (electro-estimulación) y bioquímica (factores de crecimiento) que contribuye de forma significativa a la diferenciación de las NSC hacia neuronas o astrocitos [10].

Aún existe controversia sobre qué mecanismos afectan o están detrás de las respuestas celulares observadas. Está demostrado, en la literatura [2] y [11], que el grado de oxigenación del grafeno influye en la proliferación y diferenciación de las NSC. El OG, debido a los grupos oxigenados que posee en su superficie, presenta una mayor hidrofiliidad en comparación con el rOG (similar en propiedades al grafeno), lo que conlleva a una mayor adherencia y proliferación de las células. Sin embargo el rOG, consigue un mayor grado de diferenciación de las NSC debido a que induce la electroactividad de las mismas atribuido a su mayor conductividad eléctrica. Sin embargo, existen pocos trabajos que evalúen de forma comparativa las respuestas celulares empleando nanomateriales de grafeno con diferentes grados de oxidación y se hace necesario abundar en esta comparativa para comprender mejor los factores inherentes al nanomaterial que intervienen en las respuestas celulares.

La dispersabilidad de estos nanomateriales de grafeno en la matriz polimérica también es un punto crítico en el desarrollo de estas membranas *composite*, debido a la dificultad de obtener una distribución homogénea de los nanomateriales en la matriz polimérica. Por ello, se considera importante estudiar cómo influye la química de estos materiales incorporados en la membrana polimérica en la proliferación y diferenciación celular,

además de evaluar el grado de dispersión obtenida del nanomaterial en la membrana y cómo influye esta distribución sobre las respuestas celulares.

### **1.1. Objetivo.**

El presente trabajo se desarrolla en el grupo de investigación Tecnologías Medioambientales y Bioprocesos (TAB) del Departamento de Ingenierías Química en estrecha colaboración con el Grupo de Biología Celular del Núcleo del Departamento Anatomía y Biología Celular, ambos de la Universidad de Cantabria.

En este trabajo se han sintetizado membranas *composite* de PCL/OG mediante una técnica de inversión de fases desarrollada en el grupo TAB [2], [6] y se han caracterizado la morfología, la composición química de las membranas y la distribución de los nanomateriales en la matriz polimérica y las propiedades térmicas, electro-conductoras y de transporte de nutrientes. Se han incorporado diferentes nanomateriales de grafeno en las membranas *composite* de PCL/OG sintetizadas. Por un lado se han empleado nanomateriales basados en grafeno, sintetizados mediante un novedoso método de exfoliación anódica con distintos grados de oxidación (20% y 2% de oxígeno) y que han sido suministrados por el grupo de Materiales Carbonáceos, del Instituto Nacional del Carbón perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas Español (INCAR-CSIC) y se compararán con un óxido de grafeno reducido sintetizado en el grupo TAB mediante un método de exfoliación basado en el método Hummers modificado [12, 13].

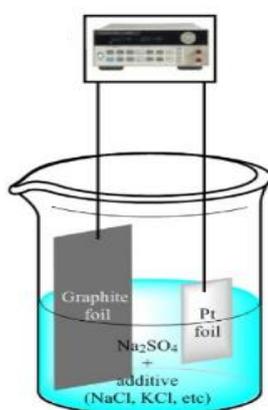
El objetivo del trabajo consiste en evaluar si existe una influencia del estado de oxidación, en la diferenciación de los astrocitos (células gliales) mediante el uso de las nuevas membranas *composite* PCL/OG sintetizadas como sustrato para los cultivos celulares *in vitro*.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Fabricación de membranas compuestas: PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox.

#### 2.1.1. Síntesis y procesado del óxido de grafeno (2% y 20% oxígeno).

Para la fabricación de las membranas compuestas de PCL/OG se ha usado un óxido de grafeno (OG) sintetizado mediante un método electroquímico (suministrado por el INCAR, Oviedo) (**Figura 3**). Munuera et al. [14] aplican un proceso de exfoliación anódica de las láminas de grafito. Utilizan este proceso ya que consigue unos rendimientos y unos grados de delaminación del nanomaterial superiores a la exfoliación catódica. El método convencional de llevar a cabo la exfoliación anódica es usando como electrolitos ácido sulfúrico o sales sulfatadas. El inconveniente de este proceso es que el grafeno anódico tiene una fuerte tendencia a oxidarse durante la exfoliación debido al ataque de los radicales oxigenados, generados por la oxidación de las moléculas de agua en el ánodo de grafito. Con esta técnica se consigue OG, en nuestro caso con un ratio O/C de 0,2 (20% oxígeno). Este grado de oxidación tan elevado compromete la calidad estructural del nanomaterial, que se busca ser más semejante al grafeno de calidad sintetizado por la técnica de Deposición Química en Vapor o *Chemical Vapor Deposition* (CVD), por ello Munuera et al. [14] desarrollan en su artículo un proceso de exfoliación anódica que usa el NaCl como un coelectrolito que previene la oxidación del material grafitico. Con este proceso se obtienen OG con un ratio O/C del 0,02 (2% oxígeno) y con una alta calidad estructural, teniendo una química y unas propiedades eléctricas más parecidas al grafeno que al propio OG.



**Figura 3.** Exfoliación anódica del grafito [14].

### *2.1.2. Preparación de la disolución polimérica.*

Se quiere preparar una disolución polimérica de policaprolactona (PCL) al 15 wt% con óxido de grafeno (OG) al 0,1 wt% empleando N-metil-2-pirrolidona (NMP, 99% de pureza) como disolvente empleando el siguiente procedimiento experimental:

- 1. Mezclar el OG con el disolvente orgánico.** Se mezcla en un vaso de precipitados el OG y se añade el disolvente orgánico NMP. Posteriormente se tapa el vaso con parafilm.
- 2. Sonicar la disolución de OG.** Introducir la punta de ultrasonidos a mitad de la disolución. La disolución con OG al 2% O/C se ha sonicado durante 10 minutos al 20% de amplitud. La disolución con OG al 20% O/C, al estar en forma de láminas, para obtener una disolución lo más homogénea posible se ha sonicado 10 minutos + 10 minutos al 20% de amplitud de onda.
- 3.** Una vez obtenida una dispersión homogénea se añade a la masa de PCL (15wt%) contenida en botes de plástico que se cierran y sellan con parafilm y se depositan en un agitador de rodillos (Roller Shaker 6 Basic, IKA, España) donde se mantiene una temperatura aproximadamente constante de 37°C durante 24 horas, para conseguir una disolución uniforme del polímero.

### *2.1.3. Técnica de inversión de fases mediante el proceso de casting.*

Las membranas de PCL/OG se conforman mediante la técnica de casting empleando una luz de 200  $\mu\text{m}$  en el cuchillo de casting (doctor blade). La disolución polimérica se vierte sobre un soporte de cristal y se desliza el cuchillo por encima de esta. Una vez tenemos la disolución extendida se mete el soporte de vidrio en el baño de coagulación con isopropanol (IPA, calidad técnica a granel) y se espera a que precipite. Se saca la membrana del baño y se deja 24h en una cubeta con IPA para eliminar posibles trazas del NMP. Posteriormente se sumergen las membranas en baños de agua UP durante 48 horas para eliminar trazas de disolventes orgánicos.

## **2.2. Características físico-químicas y morfológicas.**

El espesor de las membranas fue medido con un micrómetro electrónico (Standard, Series 293, Mitutoyo, España).

### 2.2.1. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

La morfología y estructura de estas membranas se ha determinado mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, EVO MA 15, Carl Zeiss, Alemania) y a un voltaje de 20 kV. Para procesar las muestras de las membranas PCL/OG se ha seguido el procedimiento explicado por Diban et al. [6]. Para las imágenes de la sección transversal, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y fracturadas. Todas las muestras fueron guardadas durante la noche a vacío y a una temperatura de 30°C. También se las realizó un sputtering con oro para poder obtener las imágenes. Mediante esta técnica se ha caracterizado la estructura y morfología de la superficie y de la sección transversal de las membranas planas PCL/OG2% y PCL/OG20%.

A partir de las imágenes SEM usando un programa de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) se ha estimado la porosidad tanto superficial como total de las membranas.

### 2.2.2. Determinación de la porosidad mediante análisis gravimétrico.

Adicionalmente al método de análisis de imagen, la porosidad global o *bulk* de las membranas PCL/OG se ha determinado mediante un método gravimétrico.

El procedimiento seguido para este análisis se basa en recortar muestras de 3x3 cm en húmedo retirando el exceso de agua en su superficie con un paño de papel adsorbente y pesarlas en una balanza analítica de recisión ( $W_1$ ). Seguido se introducen todas las muestras en un horno de vacío a una temperatura constante de 30°C durante 48 horas. Una vez pasadas las 48 horas se volverán a pesar las muestras en la balanza de precisión ( $W_2$ ). Se realiza este procedimiento gravimétrico para analizar la porosidad debido a la naturaleza hidrofóbica de la membrana. Las gotas de agua quedan retenidas en los poros de la matriz polimérica, por ello, usando la correlación (1) se calcula la porosidad como el peso en húmedo menos el peso en seco, asumiendo que la cantidad de agua evaporada de la membrana corresponde a la fracción de poros en la misma.

$$\varepsilon [\%] = \frac{\frac{W_1 - W_2}{\delta_{solvente}}}{\left(\frac{W_1 - W_2}{\delta_{solvente}}\right) + \left(\frac{W_2}{\delta_{PCL}}\right)} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde:

$W_1 = \text{masa de la muestra en húmedo [mg]}$

$W_2 = \text{masa de la muestra en seco [mg]}$

$\delta_{\text{solvente}} = \text{densidad del agua [mg} \cdot \text{cm}^{-3}]$

$\delta_{\text{PCL}} = \text{densidad del polímero [mg} \cdot \text{cm}^{-3}]$

### 2.2.3. Espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

El FTIR es una técnica que proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias orgánicas e inorgánicas [15]. Esto quiere decir, cuando la radiación de rayos infrarrojos alcanza una muestra, parte de esa radiación es absorbida por la muestra y otra parte la atraviesa (se transmite). La señal resultante en el detector es un espectro que representa la huella molecular de la muestra. Mediante la aplicación de la transformada de Fourier, el equipo es capaz de convertir esta señal de salida del detector en un espectro interpretable. Esta técnica sirve para identificar sustancias y materiales debido a que cada molécula que los compone produce huellas espectrales distintas [16].

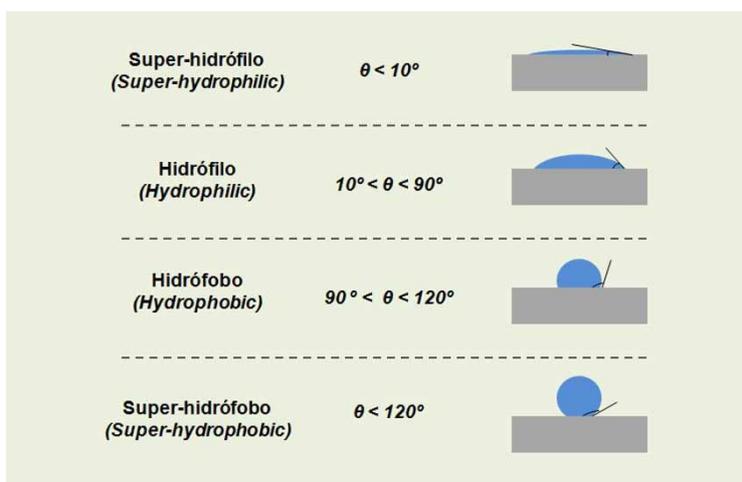
Las muestras sólidas de las membranas se analizaron con un espectroscopio infrarrojo por transformada de Fourier Spectrum 65 spectrometer (Perkin Elmer, España) acoplado a un sistema de Reflectancia Total Atenuada, ATR (GladiATR, PIKE Technologies, USA).

### 2.2.4. Ángulo de contacto.

Los materiales en los que el agua tiene tendencia a expandirse por su superficie maximizando el contacto, formando interacciones o incluso se disolviéndose en esta, tienen afinidad por el agua, se conocen como hidrofílicos. Aquellos que por su naturaleza química repelen el agua, no son capaces de interactuar con ella, y forman gotas son materiales hidrofóbicos [17]. Suele coincidir que los materiales hidrofílicos contienen moléculas polares (moléculas capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua), y los materiales hidrofóbicos contienen moléculas no polares. El ángulo de contacto [18] que forma una gota de agua entre su borde y la superficie del material

bajo ella permite estimar las características hidrofílicas/hidrofóbicas de dichas superficies (**Figura 4**).

En este trabajo se ha analizado el ángulo de contacto depositando una gota de agua ultrapura con una jeringuilla sobre las membranas secas e inmediatamente se han fotografiado. Las fotos se han procesado con el programa Measure (C Thing Software) y se han anotado los resultados tanto del ángulo de contacto izquierdo como del derecho, tomando como resultado final la media entre ambos.



**Figura 4.** Criterios de hidrofiliidad/hidrofobicidad [18].

### 2.2.5. Espectroscopia Raman.

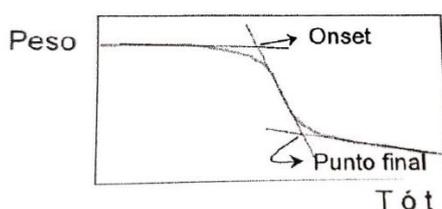
En el presente trabajo se evaluó la calidad de la dispersión y localización del OG en la matriz polimérica empleando la medida del espectro Raman en una línea de 20 mm de longitud sobre la superficie externa de las membranas en intervalos de 2 mm y del espectro en 30  $\mu\text{m}$  hacia el centro del espesor de las membranas. Para ello se utilizó un espectrómetro triple T64000 (Horiba) equipado con un microscopio confocal y un detector con un dispositivo de carga acoplada (Jobin Yvon Symphony) enfriado con nitrógeno líquido. Se hizo incidir un haz de longitud de onda de 514 nm desde un láser iónico Criptón-Argón con un objetivo de 100x para la detección. Se empleó una potencia efectiva del láser de 2 mW para todas las mediciones. Los espectros se estandarizaron teniendo en cuenta el tiempo de conteo y el número de acumulaciones dependiendo de la muestra analizada. Cada pico de las curvas espectrales se ajustó usando funciones Lorentzianas (Origin 6.0, OriginLab Corporation).

### 2.3. Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA).

En este trabajo se han analizado muestras entre 5-11 mg sujetas a una rampa de temperaturas de 10°C/min desde 30 hasta 650°C, régimen de calentamiento. Las muestras fueron expuestas a una atmósfera de nitrógeno y el caudal del gas suministrado fue de 50 mL/min.

A partir de los resultados del TGA se han obtenido los valores de 2 temperaturas características y que se usan para la identificación de los mismos (**Figura 5**):

- **Temperatura onset:** es la temperatura de inicio y se calcula como la intersección de las tangentes a la curva inicial de pérdida de masa y a la curva principal.
- **Temperatura de punto final:** es la temperatura final y se calcula como la intersección de las tangentes a la curva final de pérdida de masa y a la curva principal.



**Figura 5.** Temperaturas características de un TGA.

Las pérdidas de masa están asociadas a procesos de descomposición de materiales, evaporación de sustancias y reducción o desorción de compuestos. A su vez, las ganancias de masa están asociadas a oxidaciones o absorciones de compuestos [19].

También, durante del ensayo de termogravimetría el equipo procede a llevar a cabo un análisis térmico diferencial (DTA), que suministra información sobre los cambios térmicos que no involucran cambio de masa en la muestra.

### 2.4. Análisis de la conductividad eléctrica de las membranas mediante voltametría.

La conductividad de un material viene definida como la capacidad de un material o sustancia para dejar pasar la corriente eléctrica a su través. Esta propiedad viene determinada por la estructura atómica del material, los metales son buenos conductores debido a la gran masa de electrones con enlaces débiles que poseen. La conductividad también depende de otros factores físicos como la temperatura. Se

denota con la letra griega sigma,  $\sigma$ , y se define como la inversa de la resistividad. Se suele expresar en Siemens (Amperios/ Voltios) por unidad de longitud [ $S \cdot m$ ] [20].

La resistividad se describe como la cantidad de corriente eléctrica que soporta un material. Si un material opone mucha resistencia al paso de la corriente eléctrica se dice que tiene una resistividad elevada, material aislante (plásticos, etc.). Por el contrario, si el material ofrece muy poca resistencia al paso de la corriente eléctrica se dice que tiene baja resistividad, material conductor (metales, etc.) [20].

Para analizar la resistividad de las membranas compuestas PCL/OG se ha realizado una voltametría cíclica. Se tomaron muestras de 3 x 3 cm de área específica ( $A_e$ ) y se pinzaron con dos electrodos a 0,5 cm de distancia entre ellos. A cada muestra se le aplicaron 2 ciclos de voltaje, de 0 a -2,5 V; de 2,5 a 0 V. Se realiza primero el ciclo de bajada para reducir todos los compuestos del material y luego el ciclo de subida para oxidarlos por completo.

La resistividad de las membranas se denota con la letra griega rho,  $\rho$ , y viene definida por la ec. 2. Se expresa en ohmios por unidad de longitud [ $\Omega \cdot m$ ].

$$\rho = \frac{V \cdot A_e}{I \cdot D_e} = \frac{1}{\sigma} \cdot \frac{A_e}{D_e} \quad (2)$$

$V =$  voltaje suministrado [V]

$I =$  intensidad medida [A]

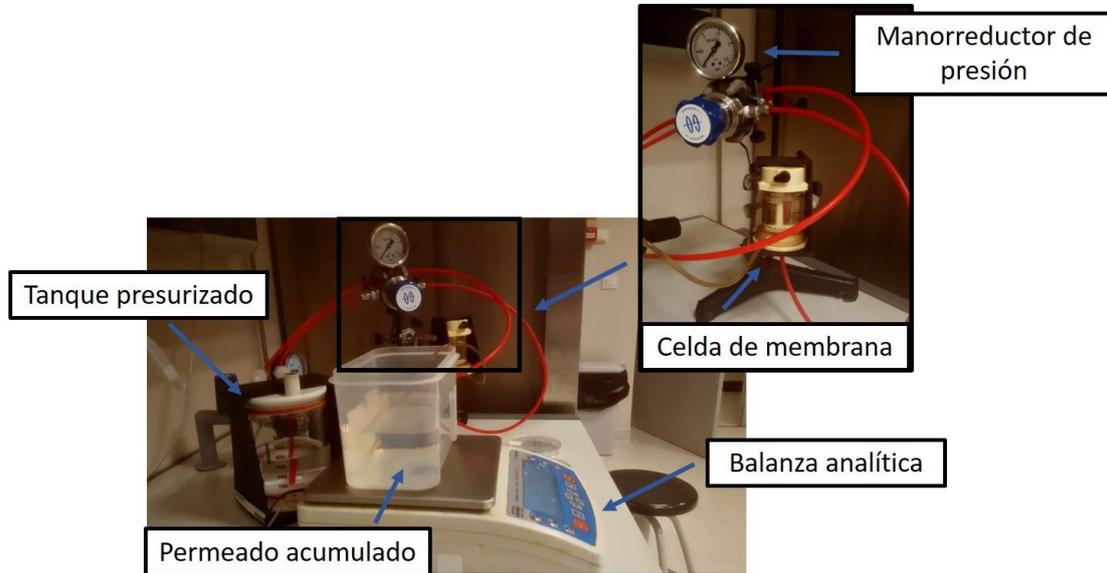
$A_e =$  área específica de la muestra [ $cm^2$ ]

$D_e =$  distancia entre los electrodos [cm]

## 2.5. Caracterización del flujo de agua. Permeabilidad hidráulica.

Se ha estudiado el flujo de agua que pasa a través de las membranas para poder estimar sus propiedades de flujo de nutrientes a través de la determinación de la permeabilidad hidráulica. Para ello se ha montado un sistema, mostrado en la **Figura 6**, que consiste en un tanque de agua ultrapura (MilliQ, Millipore) presurizado (2,2 bar) conectado a un portamembranas, con un área efectiva de membrana de 13,4  $cm^2$  ( $A_e$ ), al cual se le irá variando la presión en ciclos cerrados ascendentes y descendentes entre 0,1- 0,3 bar, y

un tanque sobre una balanza que mide los gramos de permeado acumulados con el tiempo. Se llevan a cabo 3 ciclos consecutivos (Subida: 0,1 – 0,2 – 0,3 bar; Bajada: 0,3 – 0,2 – 0,1 bar; Subida: 0,1 – 0,2 – 0,3 bar) en donde para cada valor de presión se monitoriza el permeado durante 20 minutos.



**Figura 6.** Sistema de caracterización del flujo de agua.

Para calcular la permeancia de la membrana, primero se ha de calcular el flujo que pasa a través de ella. Los datos de masa de agua de permeado obtenida a cada valor de presión se registra y grafica en un software asociado a la balanza (Pomiar Win). Se obtiene una gráfica de gramos de agua acumulados frente al tiempo con diferentes valores de pendiente, asociadas a las presiones, (cuanta más pendiente tenga la recta, más flujo pasa). El flujo de permeado ( $J_w$ ) a cada presión se obtiene aplicando la ec. 3. Para hallar la permeancia de la membrana se han de graficar los flujos de permeado obtenidos a cada valor de presión frente al incremento de presiones ( $\Delta P$ ). De esa gráfica (**Figura 7**) se obtiene una regresión lineal cuya pendiente es la permeancia hidráulica ( $P_w$ ) de la membrana, ec. 4.

$$J_w [g \cdot cm^{-2} \cdot sg^{-1}] = \frac{W [g]}{A_e [cm^2] \cdot \Delta t [s]} \quad (3)$$

$$J_w [g \cdot cm^{-2} \cdot sg^{-1}] = P_w^1 [g \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1} \cdot bar^{-1}] \cdot \Delta P [bar] \quad (4)$$

<sup>1</sup> La permeancia también se puede expresar en  $[kg \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar^{-1}]$

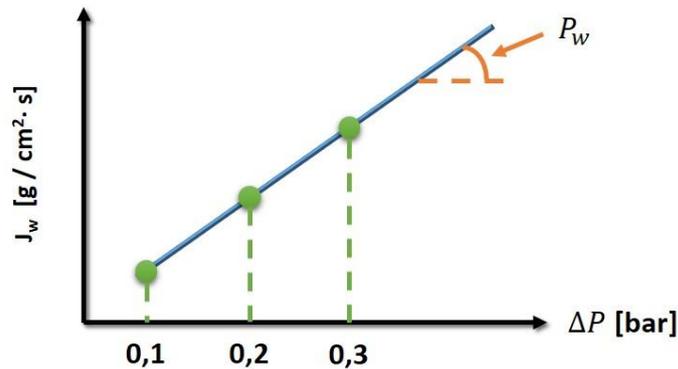


Figura 7. Flujo de permeado frente al incremento de presión.

## 2.6. Modelo experimental biológico.

Para el desarrollo del presente trabajo se ha utilizado la línea celular C6 precursoras de astrocitos. La ficha técnica correspondiente se recoge en el apartado 5 (Anexos). El trabajo experimental detallado a continuación se desarrolló en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar de nivel de bioseguridad 2<sup>2</sup>. Para el cultivo celular utilizó un incubador HERA CELL 150i (Thermo Scientific) que mantiene una temperatura constante a 37°C, una atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 95%.

### 2.6.1 Cultivo de la línea celular C6.

Las células C6 fueron aisladas a partir de un glioma de rata Wistar inducido por la inyección del carcinógeno N-nitrosometilurea [22]. Estas células crecen adheridas al fondo de una placa de Petri mostrando una morfología fusiforme, con una tasa de crecimiento elevada y donde apenas existen uniones intercelulares. La administración de dbcAMP (dibutyl cyclic Adenosin monophosphate) inhibe drásticamente su proliferación e induce cambios morfológicos que incluyen la formación de prolongaciones celulares y neuritas.

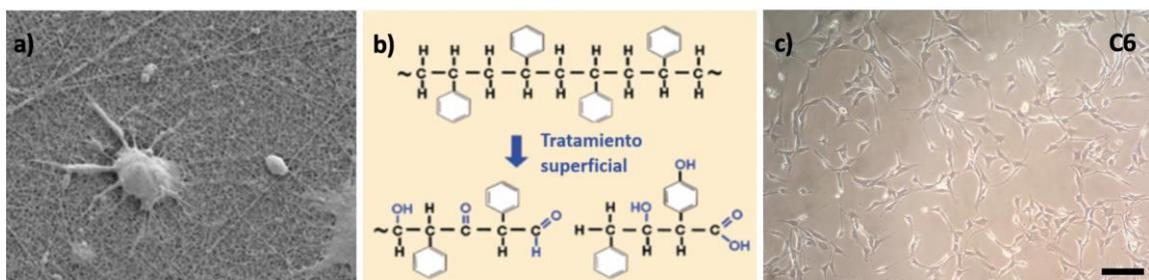
Para el cultivo rutinario de las células C6, se utilizará como medio de crecimiento DMEM “high glucose” (Dulbecco’s Modified Eagle Media, Gibco™) suplementado con:

<sup>2</sup> Se entiende por nivel de bioseguridad las condiciones bajo las cuales los agentes biológicos pueden comúnmente manipularse de forma segura. Se establecen cuatro niveles de bioseguridad según las combinaciones de prácticas y técnicas de laboratorio. En concreto, el nivel de bioseguridad 2 (nivel básico 2) está aplicado a laboratorios de diagnóstico o clínicos donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo que están asociados a enfermedades humanas [21].

- 10% de Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco™)
- 4 mM de L-glutamina
- 1% de penicilina y estreptomina (P/S, Gibco™)
- 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco™)

Para la diferenciación de las células C6 en astrocitos se utilizará como medio de diferenciación DMEM “high glucose” (Dulbecco’s Modified Eagle Media, Gibco™) suplementado con:

- 0,25% de Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco™)
- 4 mM de L-glutamina
- 1% de penicilina y estreptomina (P/S, Gibco™)
- 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco™)
- 1mM dibutilil adenosin monofosfato cíclico (dbc-AMP, Sigma)



**Figura 8.** a) Imagen de microscopía de barrido donde se observa la extensión de la matriz extracelular y la adhesión de una célula neuronal NG108. b) Modificación química de las cadenas de poliestireno que componen el fondo de las placas de Petri que permite la formación de la matriz extracelular de fibronectina y vitronectina [23]. c) Imagen de microscopía óptica invertida de contraste de fases que muestra un cultivo de células gliales C6 con una morfología fusiforme típica. Escala 100µm.

Las células hasta el momento de su cultivo se mantienen crioprotegidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio DMEM suplementado con 10% de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma). Para su descongelación se introduce el criotubo 30 segundos en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ . La suspensión celular se diluye con medio de crecimiento y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. Por acción de la fuerza centrífuga, se forma un pellet que se resuspende suavemente en medio libre de DMSO. Las células se transfieren a una placa Petri de 10 cm de diámetro (Corning™), cuya superficie debe de estar cargada negativamente con iones oxigenados ("coating"). Las proteínas adherentes fibronectina y vitronectina, presentes en el FBS del medio de crecimiento, se adhieren a la superficie de poliestireno

formando una matriz extracelular que facilita la adhesión de las células. Se cubre la placa de Petri con 10 mL de medio de crecimiento y se introducen en el incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 95%. Pasadas 24 horas, la observación directa con un microscopio de luz invertida muestra las células adheridas al fondo de la placa y con una densidad celular aproximada del 50% (**Figura 8**).

Pasadas 24 horas, se cambia el medio de crecimiento para eliminar detritus celulares y se mantienen en el incubador hasta que alcancen el 80-90% de confluencia. Para realizar el subcultivo de las células, se realizan varios lavados con tampón fosfato salino (PBS: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4).

#### *2.6.2. Método de recuento y subcultivo celular.*

Para interrumpir la adhesión de las células con la matriz extracelular se realiza una incubación con una solución al 0,25% de la enzima proteolítica (peptidasa) tripsina-EDTA en PBS durante 5 minutos a 37°C (Gibco™). Esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos formados entre proteínas transmembrana de las células C6 con la fibronectina/ vitronectina. La tripsina se inhibe añadiendo medio de cultivo con FBS, cuya composición rica en proteínas satura su actividad evitando la degradación celular [24]. Las células pierden su adhesión al fondo de la placa y son resuspendidas y transferidas a un tubo Falcon estéril de 15 ml (Corning™).

Para conocer la densidad celular se utilizará una Cámara de Neubauer, un instrumento utilizado en biomedicina para el recuento celular.

Para el subcultivo rutinario de las líneas celulares, 1x10<sup>6</sup> células se transfieren a una placa Petri, y se cubren con 10ml de medio de crecimiento. Las células se introducen en el incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 95% para su adhesión y crecimiento.

#### *2.6.3. Preparación y esterilización de membranas PCL/OG para el crecimiento celular.*

Antes de comenzar el trabajo experimental, fue necesario preparar y esterilizar las distintas membranas basadas en PCL/OG 2% Ox, PCL/OG 20% Ox y PCL/rOG para el crecimiento celular en su superficie. Utilizando un sacabocados de 14 mm de diámetro se prepararon membranas circulares que se pegaron a un cubreobjetos de vidrio con silicona quirúrgica de tipo A (Dow, Corning™) para evitar la flotación. Cada cubre se

colocó en el fondo de un pocillo de placas de 24 "multi-well" (Corning™). A continuación, se esterilizaron las membranas con varios lavados de etanol al 70% durante 30 minutos y, en seco, se exponen a rayos UV durante 15 minutos. Las placas se sellan con Parafilm hasta el momento de su uso.

Para cada experimento, se cubren las membranas de PCL/OG y PCL/rOG con una suspensión celular que resulta en la siembra de  $5 \times 10^4$  células/membrana (área efectiva de membrana  $1,54 \text{ cm}^2$ ) y se cubre con medio de crecimiento. Se traslada la placa al incubador y se deja que se adhieran las células 16 h antes de comenzar el proceso de diferenciación. Al día siguiente (d0) se cambia el medio de cultivo a medio de diferenciación cuya composición se ha descrito en el apartado 3.6.1. En este momento se fijan las muestras destinadas a los estudios a día 0. Transcurridas 24 y 48 horas del comienzo del proceso de diferenciación se fijan muestras de estos estadios (d1 y d2, respectivamente).

## **2.7. Técnica de inmunofluorescencia y Microscopía Confocal.**

Para poder analizar los cambios morfológicos y cuantificar el grado de diferenciación celular procedimos a detectar por técnicas de inmunofluorescencia el citoesqueleto celular. En primer lugar, se procede a la fijación de las células para la preservación de su morfología. Para ello se ha utilizado una solución de paraformaldehído (PFA) al 3,7% diluido en PBS preparada justo en el momento de uso por descongelación en un baño de  $60^\circ\text{C}$ . El PFA tiene la capacidad de establecer, a modo de puente, uniones entre las biomoléculas. En concreto, el paraformaldehído une con gran afinidad las aminas primarias ( $-\text{NH}_2$ ) de los aminoácidos de lisina [25]. Las células fueron fijadas a temperatura ambiente (TA) con agitación suave durante 15-30 minutos.

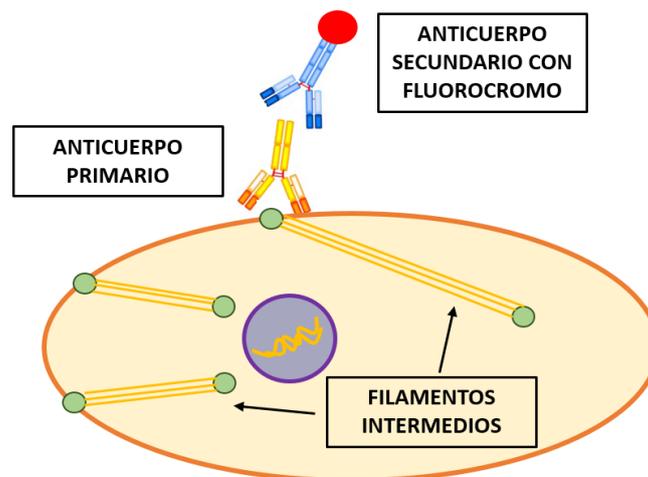
### *2.7.1. Marcaje de los filamentos finos de actina de la corteza celular y del ADN.*

Para el análisis de la morfología celular, se han marcado los filamentos finos de actina, localizados principalmente en la corteza celular, con la molécula Faloidina (Sigma) conjugada al fluorocromo FITC. Además, para el análisis del volumen nuclear se ha marcado el DNA contenido en el núcleo celular con la molécula Hoechst.

En primer lugar, se procede a la permeabilización de las células fijadas. Para ello se lavan a TA y con agitación suave con una solución del detergente no iónico Tritón-X al 0,5% en PBS durante 30 minutos. El Tritón-X solubiliza los lípidos de la membrana y rompe enlaces proteína-lípido generando microporos por donde penetran las moléculas marcadoras [26] y [27]. Las membranas se incuban con 30  $\mu$ l de cada marcador durante 30 minutos. Finalmente, se montan con medio ProLong (Invitrogen).

### 2.7.2. Inmunohistoquímica.

Para el marcaje específico de la proteína GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) se han utilizado anticuerpos específicos generados en ratón que reconocen un epítipo específico de esta proteína. Para realizar la inmunodetección indirecta de GFAP, y tras la permeabilización de las membranas, se incuban con 30  $\mu$ l de una solución diluida (1/100) de anticuerpo primario en PBS filtrado en cámara húmeda oscura durante toda la noche (o/n).



**Figura 9.** Esquema del mecanismo de inmunohistoquímica indirecta para la detección de GFAP.

Para visualizar los anticuerpos en el microscopio confocal, se necesita su detección con un segundo anticuerpo "secundario", generado en cabra y conjugado al fluorocromo Cy3 (**Figura 9**). Concluida la incubación del primario, se lavan las membranas varias veces con PBS-Tw y se incuba con una gota de anticuerpo secundario diluido 1:750 en PBS filtrado durante 45 minutos a TA en cámara húmeda oscura. Tras varios lavados con PBS se procede al montaje de las muestras tal y como se ha descrito en el apartado 3.7.1.

### 2.7.2 Microscopía Confocal.

En este trabajo, las muestras fueron examinadas en la unidad de Microscopía del IDIVAL con un microscopio confocal láser (Nikon A1R), controlado por el software NIS Elements, equipado con tres líneas de láser (Argón 488 nm, 405nm y 514 nm, HeNe 561 nm y HeNe 638 nm) y con un objetivo de 63X oil de apertura numérica 1,4 NA. Gracias a este equipamiento he podido visualizar dobles y triples marcajes fluorescentes. Para obtener las imágenes de las muestras con marcaje doble, se graban imágenes secuenciales del mismo plano focal generando así imágenes en pseudocolores que son superpuestas.

### 2.8. Análisis morfométrico y estadístico.

En el presente trabajo se han realizado los siguientes análisis cuantitativos y morfométricos durante el proceso de diferenciación a astrocito de células C6 crecidas sobre membranas PCL: i) Determinación del área nuclear, ii) cuantificación del número medio de proyecciones emitido por célula, así como su longitud media y, iii) cuantificación del porcentaje de células que expresan la proteína GFAP, componente de los neurofilamentos intermedios de la astrogliá.

En todos los análisis cuantitativos realizados, se empleó el análisis estadístico de la *t* de Student para conocer si existían diferencias significativas entre los grupos experimentales. El nivel de significación se estableció en  $*p < 0,05$ . Para los cálculos y representaciones estadísticas se utilizó el programa Prism 7 (Graph Pad).

- i) Para el estudio morfométrico del área nuclear se examinaron células C6 con diferentes grados de diferenciación (día 0, 1 y 2) en las que se había marcado el DNA celular con el marcador fluorescente Hoechst. Se utilizaron 3 imágenes de microscopía confocal sobre las que se realizó la medida del área nuclear de todas las células (n=50) con el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Las medias de los resultados obtenidos, así como sus desviaciones, se representaron en un gráfico de barras.
- ii) Para la cuantificación del número medio de proyecciones, así como de la longitud de las mismas, se marcaron los filamentos de actina de la corteza celular con el marcador fluorescente faloidina. Sobre imágenes de microscopía confocal (n=3) se

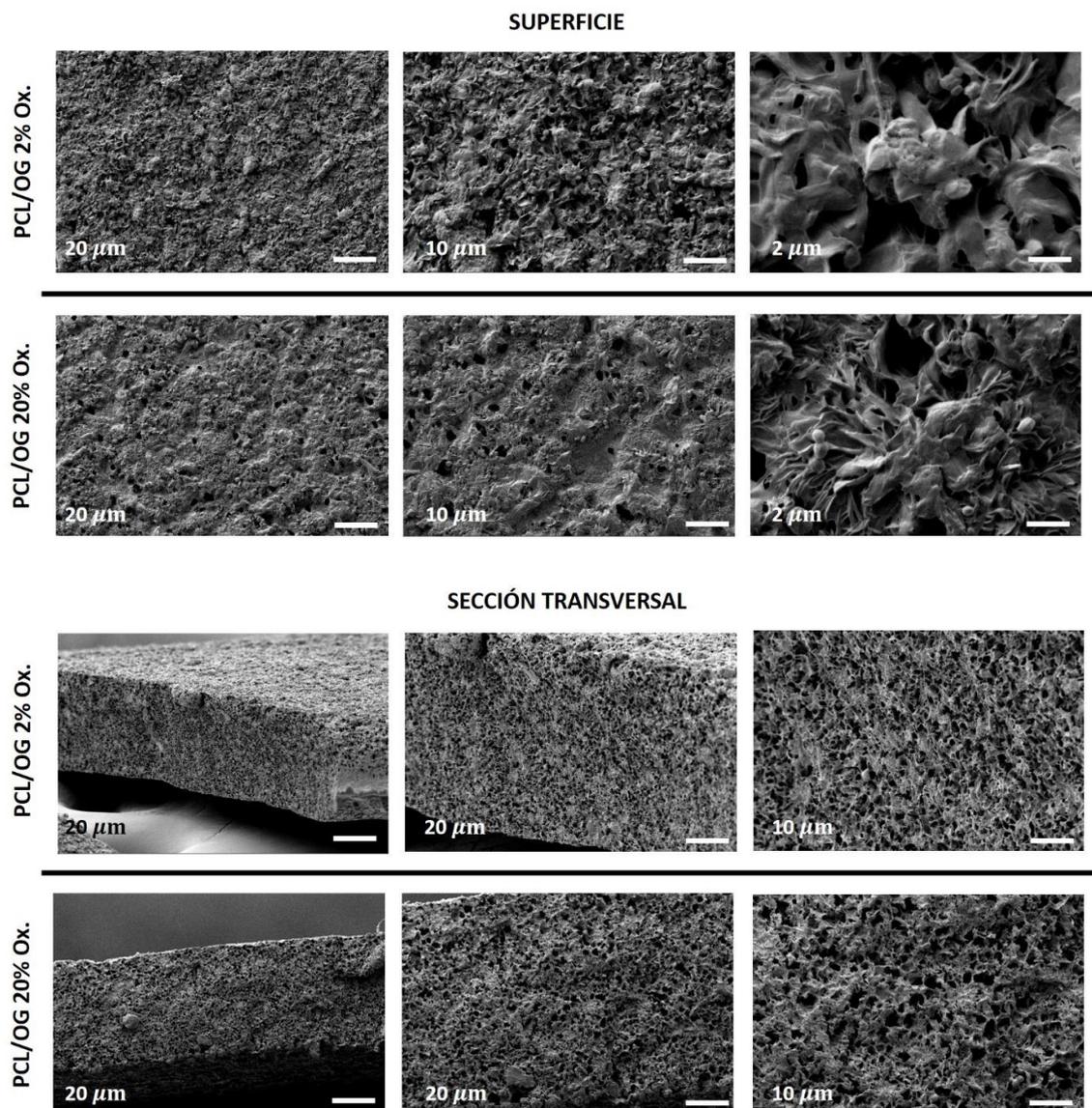
contó el número de proyecciones emitidas por cada célula y simultáneamente se midió su longitud utilizando el software ImageJ. Con todos los datos se estimó el número medio de proyecciones por célula en cada sustrato y estadio de diferenciación, así como la longitud media de las mismas. Los datos se representaron en un gráfico de barras.

iii) Para estudiar el porcentaje de células que expresan neurofilamentos intermedios GFAP-positivos se han analizado células C6 en el estadio 2 de diferenciación, inmunomarcadas con anticuerpos específicos anti-GFAP. Sobre imágenes de microscopía confocal (n=3) se ha cuantificado el número de células que expresan GFAP de manera muy superior al "background" del resto de células con poco marcaje. Los datos se representaron en un gráfico de barras.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Características fisicoquímicas de las membranas compuestas PCL/OG.

A lo largo de este apartado, para analizar las características fisicoquímicas de las membranas, se van comparar de forma análoga las membranas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox del presente trabajo con las membranas PCL/rOG y PCL/OG y PCL reportadas en la bibliografía [2] y [6] fruto de trabajos de investigación desarrollados previamente en el grupo TAB.



**Figura 10.** Imágenes SEM de la superficie y de la sección transversal de las membranas compuestas PCL/OG 2% y PCL/OG 20%.

Mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) se ha analizado la morfología de las membranas, tanto en su superficie como en su sección transversal (**Figura 10**). A su vez, se van a comparar los resultados obtenidos de las imágenes SEM con las características fisicoquímicas presentadas en la **Tabla 1** para las membranas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox. Además, se recogen los resultados obtenidos en estudios previos de las membranas de PCL, PCL/OG y PCL/rOG [6] en donde se empleó OG producido mediante una síntesis de exfoliación química y posterior reducción hidrolítica (rOG).

Para el análisis de la porosidad bulk se ha realizado un estudio gravimétrico como ha sido explicado en el apartado 3. Estos resultados, presentados en la **Tabla 1**, muestran que las membranas de PCL/OG 2% Ox tienen una porosidad bulk levemente superior a las membranas de PCL/OG 20% Ox. Este resultado se corresponde con la morfología mostrada en la **Figura 10**, donde a una resolución de 10  $\mu\text{m}$  se aprecia con más claridad que estas primeras membranas poseen una mayor porosidad con poros levemente inferiores. Aun así, ambas membranas presentan una morfología tipo esponja, característica de la técnica de inversión de fases utilizada en la fabricación de membranas compuestas. También muestran un tamaño de poro bastante uniforme a lo largo de todo su espesor con una alta interconectividad de los mismos. Las membranas de PCL, PCL/OG y PCL/rOG reportadas en la bibliografía [6] también presentan la misma estructura tipo esponja con una porosidad bulk similar y un tamaño de poro uniforme en todo su espesor, exceptuando esta última, que tiene una estructura asimétrica con poros muy pequeños en la superficie y aumentando su tamaño hacia el interior de la membrana.

Los espesores de las membranas PCL/OG con 2% y 20% de oxígeno tienen unos espesores similares, entorno a las 200  $\mu\text{m}$ , mientras que las membranas de PCL, PCL/OG y PCL/rOG les tienen inferiores, entorno a las 100  $\mu\text{m}$  (Suministrado en la bibliografía, **Tabla 1**) [6]. Esta diferencia puede ser debida a que el cuchillo de casting se recalibró en el trabajo actual.

La porosidad superficial ( $\epsilon_s$ ) ha sido analizada mediante el software de procesamiento de imagen Fiji (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) sobre las imágenes SEM mostradas en la **Figura 10**. A la vista de los resultados, presentados en la **Tabla 1**, se corresponde este aumento en la porosidad (1,5 veces superior)

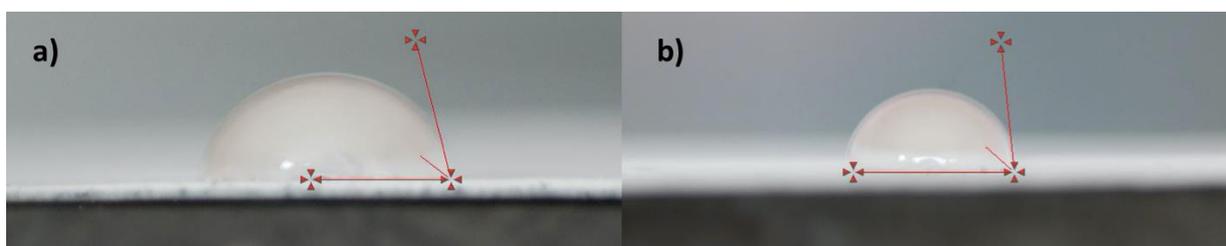
superficial de las PCL/OG 2% Ox comparadas con las de PCL/OG 20% Ox, con lo observado en las imágenes SEM (**Figura 10**). Las membranas reportadas en la bibliografía [6] presentan unas porosidades superficiales menores a las mostradas anteriormente para las membranas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox, exceptuando la de PCL.

En cuanto al tamaño de poro en la superficie (**Tabla 1**), las membranas PCL/OG 2% Ox poseen poros ligeramente más pequeños y de tamaño más uniforme ( $2,5 \mu\text{m}$ ) que las membranas de PCL/OG 20% Ox ( $2,8 \mu\text{m}$ ). Estas membranas presentan unos valores de poro similares a los reportados en la bibliografía [6] para la PCL ( $1,3 \mu\text{m}$ ) y para la membrana PCL/OG ( $2,7 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, la membrana de PCL/rOG presenta una estructura asimétrica con poros más pequeños en la superficie que aumentan su tamaño cuando se desciende en el espesor. Por ello se estimó el tamaño de poro en la sección transversal obteniendo un valor estimado para la parte superior de esta membrana de  $2,8 \mu\text{m}$  y  $6,1 \mu\text{m}$  en la parte inferior. Comparando globalmente todos los resultados se observa una tendencia a reducir la porosidad superficial y aumentar el tamaño medio de poro cuando se introducen en la matriz polimérica estos nanomateriales. Esto es debido, según se explica en la bibliografía [6], a que las disoluciones poliméricas al estar mezcladas con el grafeno disminuyen su viscosidad y esto hace que el proceso de intercambio solvente-no solvente se acelere durante la inversión de fases. Esto conlleva la formación de poros de mayor tamaño en la superficie y, por tanto, una disminución de la porosidad superficial.

La mayoría de los polímeros, en concreto la PCL, son materiales hidrófobos. Según Kumar et al. [28] explican en su artículo, al añadir a la matriz polimérica nanomateriales, como el óxido de grafeno, cambian las propiedades fisicoquímicas de las membranas. Analizando los ángulos de contacto de las membranas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox vemos que tienen un comportamiento hidrofílico, ya que sus ángulos de contacto son menores de  $90^\circ$  (**Figura 11 y Tabla 1**). A pesar de que las membranas PCL/OG 2% Ox tienen mucha menos presencia de grupos oxigenados en su estructura, se observa que el valor medio del ángulo de contacto es menor que para el caso de las membranas PCL/OG 20% Ox, aunque no muestran diferencias estadísticamente significativas

( $p > 0,05$ ). Esto podría ser debido a ligeras diferencias en la rugosidad superficial de la membrana.

Si comparamos los ángulos de contacto de estas membranas con los datos reportados en la bibliografía [2] presentados en la **Tabla 1** (membranas de PCL, PCL/OG y PCL/rOG), vemos que dichos ángulos son mayores. Esto puede ser debido a la diferencia de rugosidad, explicado anteriormente (**Figura 10**), el cual es un factor que afecta de forma considerable al ángulo de contacto. Las membranas PCL/OG con 2% y PCL/OG 20% Ox presentan superficies más rugosas que las demás membranas, hecho que podría explicar por qué sus ángulos de contacto son un poco menores al resto de las membranas aquí comparadas, aun así los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11.** Ángulos de contacto de las membranas de (a) PCL/OG 2% de oxígeno y (b) PCL/OG 20% oxígeno.

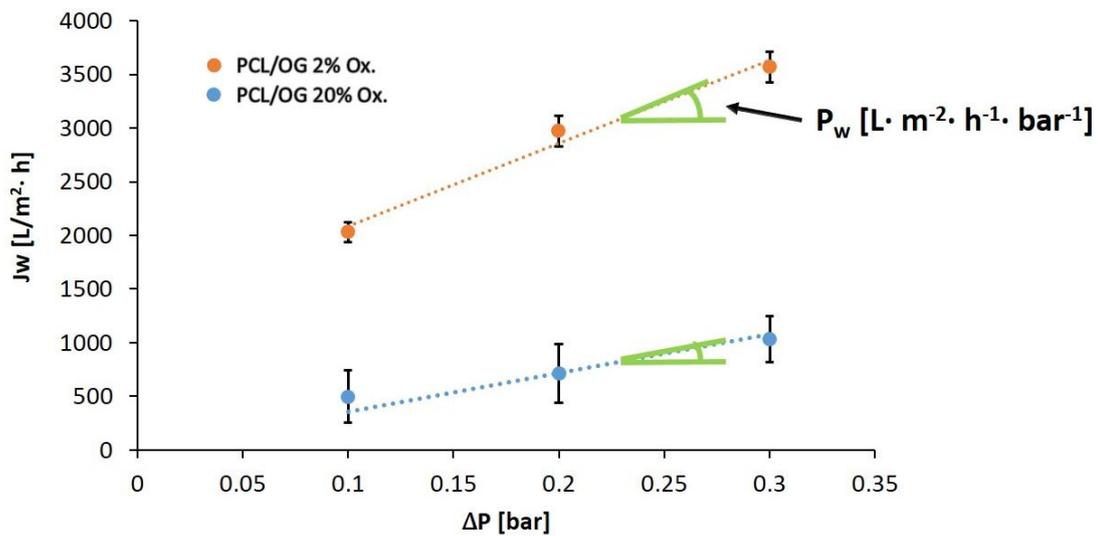
**Tabla 1.** Características fisicoquímicas morfológicas y propiedades eléctricas de las membranas compuestas PCL/OG con 2% y 20% de oxígeno y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL, PCL/OG y PCL/rOG.

	PCL/OG 2% OX	PCL/OG 20% OX	PCL	PCL/OG	PCL/rOG
<b>POROSIDAD SUPERFICIAL, <math>\epsilon_s</math> [%]</b>	$30 \pm 9$	$20 \pm 6$	$40 \pm 4$ [6]	$9 \pm 1$ [6]	$13 \pm 2$ [6]
<b>POROSIDAD BULK<sup>3</sup>, <math>\epsilon</math> [%]</b>	$82 \pm 0,1$	$80 \pm 0,2$	$81 \pm 1$ [6]	$76 \pm 1$ [6]	$80 \pm 1$ [6]
<b>ESPESOR [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	$164 \pm 19$	$175 \pm 13$	$91 \pm 5$ [6]	$85 \pm 6$ [6]	$97 \pm 8$ [6]
<b>TAMAÑO MEDIO DE PORO [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	$2,5 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,6$	$2,7 \pm 1,3$	$2,8 \pm 0,8$ (zona superior) y $6,1 \pm 1,3$ (zona inferior)
<b>ÁNGULO DE CONTACTO [°]</b>	$70 \pm 10$	$86 \pm 4$	$96 \pm 11$ [2]	$72 \pm 10$ [2]	$94 \pm 4$ [6]

<sup>3</sup> Porosidad bulk: es la porosidad de la membrana en su conjunto, es decir, la porosidad presenta todo el volumen de membrana.

### 3.2. Caracterización del flujo de agua. Permeabilidad hidráulica.

En la **Figura 12** se muestran los flujos de permeado y la permeancia hidráulica de las membranas PCL/OG con 2% y PCL/OG 20% Ox (**Tabla 2**), obtenidos a diferentes presiones transmembrana. Se ve un claro incremento en los flujos de permeado, así como en la permeancia hidráulica por parte de las membranas PCL/OG 2% Ox. Este incremento en la permeancia de las membranas puede ser debido a que presentan una mayor porosidad bulk ( $\epsilon$ ) (**Tabla 1**), en comparación con las membranas PCL/OG 20% Ox, además de tener una mayor interconexión entre los poros, y a pesar de tener ligeramente menores tamaños de poro.



**Figura 12.** Flujos de permeado a diferentes presiones transmembrana y cálculo de la permeancia ( $P_w$ ) mediante la pendiente de la recta.

Si se comparan estos valores de permeancia con los valores reportados en la bibliografía [18] para las membranas PCL, PCL/OG y PCL/rOG se ven bastantes similitudes (**Tabla 2**). Las membranas de PCL/OG presentan unos valores de permeancia muy similares a las membranas PCL/OG 20% Ox. Esto se corresponde con estructura porosa que poseen, con una porosidad bulk similar, aunque con un tamaño de poro menor. Estos resultados son congruentes ya que las propiedades de ambos nanomateriales en términos de grado de oxidación son muy similares. Sin embargo, las membranas PCL/rOG presentan una permeabilidad aproximadamente 2 veces superior a la de las membranas PCL/OG 2% Ox, atribuido por su estructura porosa y morfología. Las primeras presentan una sección transversal asimétrica, como se comentó anteriormente, lo que le confiere a las

membranas de una resistencia mucho menor al transporte de nutrientes debido a que el espesor que ejerce esta resistencia al flujo es mucho menor al de las demás membranas reportado en la bibliografía [6]. Esto se vería traducido en un incremento en la permeancia, mientras que las membranas PCL/OG 2% Ox presentan una estructura simétrica con una porosidad homogénea en todo su espesor. Por último, la membrana de PCL presenta una permeancia intermedia con respecto a las demás.

**Tabla 2.** Permeancias hidráulicas de las membranas PCL/OG con 2 % y 20% Ox y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL, PCL/OG y PCL/rOG.

<b>MATERIAL DE LA MEMBRANA</b>	<b>PERMEANCIA [L· m<sup>-2</sup>· h<sup>-1</sup>· bar<sup>-1</sup>]</b>
<i>PCL</i> [6]	14437 ± 1860
<i>PCL/OG 2% Ox</i>	13788 ± 832
<i>PCL/OG 20%Ox</i>	4336 ± 2160
<i>PCL/rOG</i> [6]	36189 ± 1860
<i>PCL/OG</i> [6]	4685 ± 4789

### 3.3. Análisis de las propiedades eléctricas de las membranas compuestas PCL/OG.

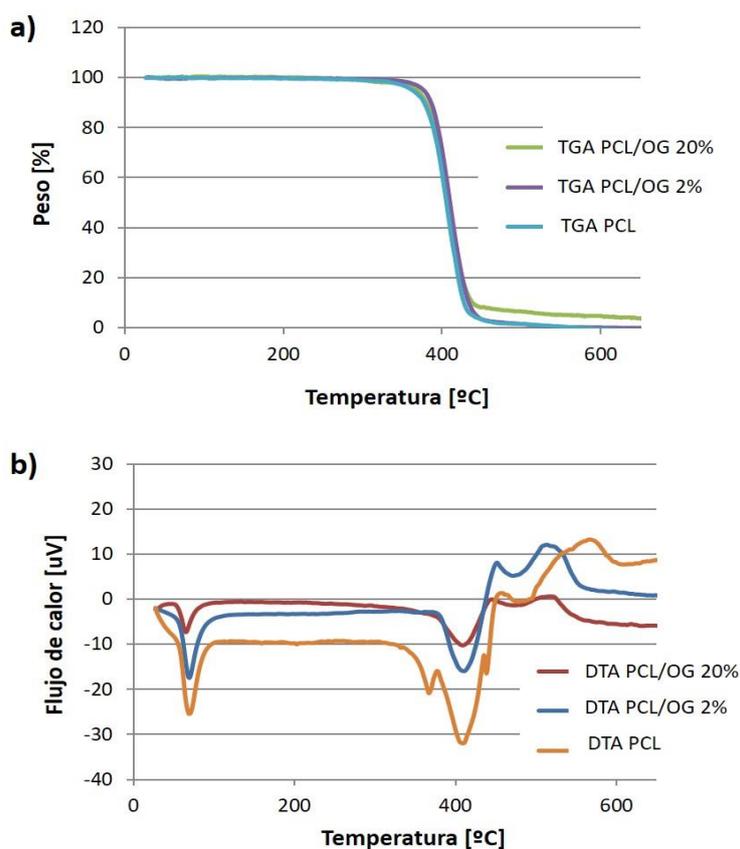
La resistividad obtenida para las membranas de PCL/OG 20% Ox está entorno a los  $5 \times 10^6 \pm 4 \times 10^6$ , mientras que la de las membranas PCL/OG 2% Ox está entorno  $2 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$ . Esta diferencia en los resultados es debida a la elevada conductividad que presenta el grafeno con 2% de oxígeno ( $34 \cdot 10^3 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ ) comparada con la del OG al 20% de oxígeno ( $5,4 \cdot 10^3 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ ), según reportan Munuera et al. [14] en su artículo acerca de estos nanomateriales.

A pesar de estas diferencias en las conductividades de los nanomateriales, ambas membranas presentan una elevada resistividad eléctrica (son aislantes). Estos nanomateriales se caracterizan por sufrir una transición de aislante a conductor cuando están sometidos a una determinada concentración de carga conductora. Esto es conocido como umbral de percolación eléctrica. En las membranas compuestas de polímeros y nanomateriales conductores, el umbral de percolación depende de las condiciones de procesamiento, de las propiedades de la matriz polimérica y de las características propias del nanomaterial [29]. En las membranas tratadas en este trabajo la carga de nanomaterial en la matriz polimérica es tan pequeña (0,1% en peso en la

disolución polimérica) que no se supera el umbral de percolación eléctrica, por lo que siguen siendo aislantes.

### 3.4. Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA).

En la **Figura 13** se presenta el análisis térmico TGA-DTA de las membranas compuestas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox y su comparativa con las membranas de PCL reportadas en la bibliografía [6].



**Figura 13.** Termogramas (a) TGA y (b) DTA de las membranas compuestas PCL/OG 2% Ox, PCL/OG 20% Ox y de PCL [6].

En la **Tabla 2** se presentan las temperaturas características,  $T^a$  onset y  $T^a$  punto final, de las membranas compuestas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox obtenidas de la **Figura 13 a**, y su comparativa con las propiedades térmicas de la membrana PCL [6], de la PCL en pellets (sin procesar) [30] y del grafeno [31]. Todos los materiales recogidos en la **Tabla 3** han sido analizados bajo las mismas condiciones experimentales, recogidas en el Apartado 3 (Materiales y Métodos) de este trabajo.

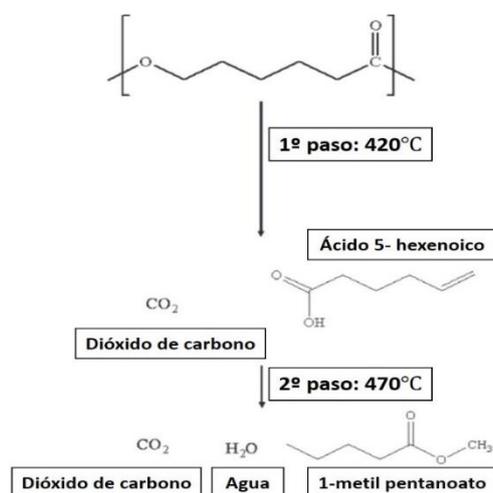
**Tabla 3.** Temperaturas características de un TGA para las membranas compuestas PCL/OG con 2% y 20% de oxígeno y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL, del grafeno y de la PCL en pellets.

MATERIAL	Tª ONSET [°C]	Tª PUNTO FINAL [°C]
<b>Grafeno puro</b> <sup>[31]</sup>	430	525
<b>PCL pellets</b> <sup>[30]</sup>	390	440
<b>PCL membrana</b> <sup>[6]</sup>	374	422
<b>PCL/OG 20% Ox</b>	378	425
<b>PCL/OG 2% Ox</b>	378	436

Los datos de degradación de la PCL (pellets) obtenidos en el presente trabajo (**Tabla 3**) coinciden con los referenciados por Unger et al. [30] en donde se propone que la degradación térmica de la PCL de alto peso molecular (80.000 g/mol) en forma de pellets tiene lugar por encima de los 390 °C, siendo máxima a los 420 °C, según el mecanismo de degradación que se muestra en la **Figura 14**.

Comparando las temperaturas de las membranas con los materiales puros, sin procesar, vemos que estos últimos son más estables térmicamente. La estabilidad térmica de la PCL disminuye al estar procesada en forma de membrana. Esta diferencia en la estabilidad térmica puede deberse a las modificaciones de organización estructural que sufren las cadenas hidrocarbonadas del polímero al pasar del estado líquido (disolución polimérica) al sólido (membrana) cuando se realiza la inversión de fases. Cuando el polímero coagula, se forman poros y las cadenas se disponen aleatoriamente quedando restringidas a las zonas de coagulación que conforman la matriz polimérica. Debido a esto las membranas poliméricas tienen una estabilidad térmica inferior a la del polímero sin procesar.

Analizando las propiedades térmicas de las membranas PCL/OG, se ve que aunque sí mejoran ligeramente los valores de estabilidad térmica al introducir los nanomateriales (véase valores de estabilidad térmica del grafeno en la **Tabla 3**), sus propiedades térmicas no cambian significativamente respecto a las membranas de PCL. Este hecho puede ser debido a la pequeña proporción de nanomaterial introducido en la matriz polimérica (0,1% en peso).



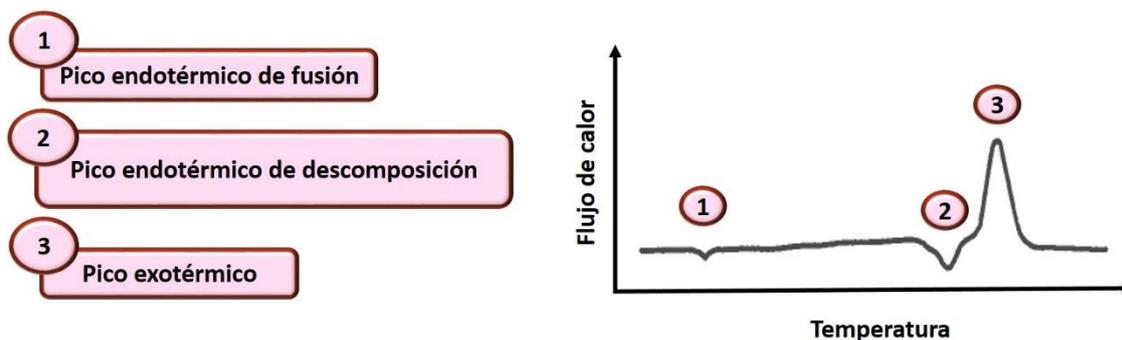
**Figura 14.** Mecanismo propuesto de degradación térmica de los pellets de PCL en atmósfera de N<sub>2</sub>. Modificada de la referencia [30].

También se realizó un DTA cuyos resultados se recogen en la **Tabla 4**. Se muestran los picos endotérmicos de fusión y de descomposición del polímero, así como picos exotérmicos de las membranas compuestas PCL/OG 2% y PCL/OG 20% Ox y de las membranas de PCL. Al aumentar la temperatura se favorece el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas del polímero, debido a que tienen más facilidad para rotar sobre los enlaces simples.

**Tabla 4.** Picos endotérmicos y exotérmicos de los DTA de membranas compuestas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox y comparativa con los datos citados en la bibliografía de las membranas PCL y de la PCL en pellets.

MATERIAL	PICOS ENDOTÉRMICOS		PICOS EXOTÉRMICOS	
	Fusión [°C]	Descomposición [°C]	1º Pico [°C]	2º Pico [°C]
<b>PCL [32] pellets</b>	61	380	453	---
<b>PCL [6] membrana</b>	68,89	409,73	462,37	566,35
<b>PCL/OG 20% Ox</b>	65,69	408,48	445,35	517,1
<b>PCL/OG 2% Ox</b>	69,24	410,71	451,35	513,34

Según explica Kaloustian et al. [32] en su artículo, los polímeros se dividen en tres grupos según la estructura de su DTA, en concreto, la PCL se sitúa en el primer grupo. Este grupo está caracterizado por tener un pico de fusión endotérmico, un pico de descomposición endotérmico y la presencia de uno o varios picos exotérmicos, de los cuales es considerado solo el último. Estos picos se muestran en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Picos característicos de un DTA genérico para la PCL. Modificado del artículo Kaloustian et al. [32].

Si se comparan los datos de los pellets de PCL con los suministrados por Kaloustian et al. [32] durante su estudio de propiedades térmicas de la PCL, se observa que son semejantes y que aparecen dos picos endotérmicos (**Figura 15 y Tabla 4**). Además en el caso de los pellets de PCL ambos picos endotérmicos aparecen a temperaturas inferiores a los de las membranas, tanto las compuestas como la del polímero solo. También se observa que el DTA de la PCL en pellets solo presenta un pico exotérmico (**Tabla 4**), mientras que en las membranas se observan 2. Esta diferencia puede ser debida a que las condiciones de procesamiento de la muestra de PCL modifican las propiedades cristalinas del polímero.

Si analizamos los diagramas de las membranas compuestas con el DTA de las membranas de PCL (**Figura 13 b**) se aprecia que, tanto las membranas compuestas PCL/OG como las membranas de PCL presentan unos picos de fusión y de descomposición endotérmicos muy similares. Sin embargo, los picos exotérmicos son superiores los de la PCL que los de las membranas compuestas. Se observa que la introducción de nanomateriales en la matriz polimérica no influye significativamente en los mecanismos de fusión y descomposición del polímero.

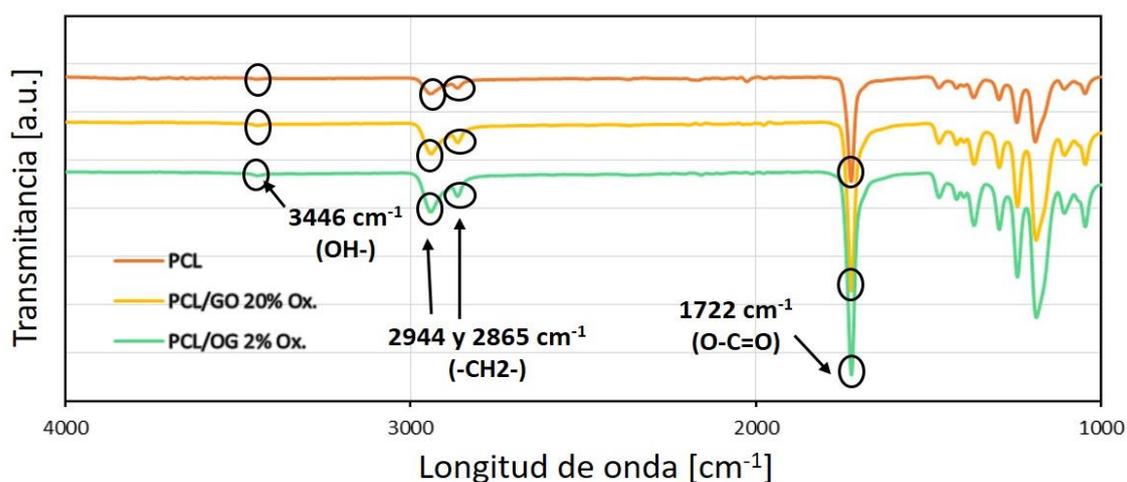
Es interesante comparar simultáneamente el TGA con el DTA para establecer analogías entre las pérdidas de masa y los picos de fusión y descomposición del polímero (**Figura 13a y 13b**). El primer pico del DTA (pico de fusión) de todas las membranas no conlleva una pérdida de masa significativa en el TGA. El segundo pico del DTA coincide con la principal pérdida de masa en el TGA, esto es debido a la degradación del polímero como consecuencia de la temperatura. Estos picos, entorno a los 400 °C, aparecen entre la temperatura onset y la de punto final de pérdida de masa. Esto muestra que la pérdida

de masa empieza un poco antes de que se alcance la temperatura de descomposición del polímero, y este sigue degradándose hasta la temperatura de punto final.

Por último, los picos exotérmicos de las membranas de PCL/OG 2% y PCL/OG 20% Ox observados en el DTA (**Figura 13 b**), presentan un ligero retraso con respecto a los de la membrana de PCL. Según explican Balu et al [33], los picos exotérmicos de las membranas PCL se retrasan ligeramente cuando se incorporan materiales a la matriz polimérica. Esto es debido a la reacción de injerto que sufren las nanopartículas de grafeno y OG en la matriz polimérica. Por ello ambos picos exotérmicos en las membranas compuestas PCL/OG 2% y PCL/OG 20% Ox están ligeramente retrasados con respecto a la PCL pura.

### 3.5. Técnicas espectroscópicas FTIR y Raman.

Para determinar la presencia del nanomaterial (OG, rOG) en la matriz polimérica de la membrana compuesta PCL/OG con 2% y 20% de oxígeno, así como la calidad del mismo, se realizó un análisis FTIR presentado en la **Figura 16**.



**Figura 16.** Espectros FTIR para las membranas compuestas de PCL/OG 2% Ox y 20% Ox, así como el espectro de las membranas de PCL citado en la bibliografía [6].

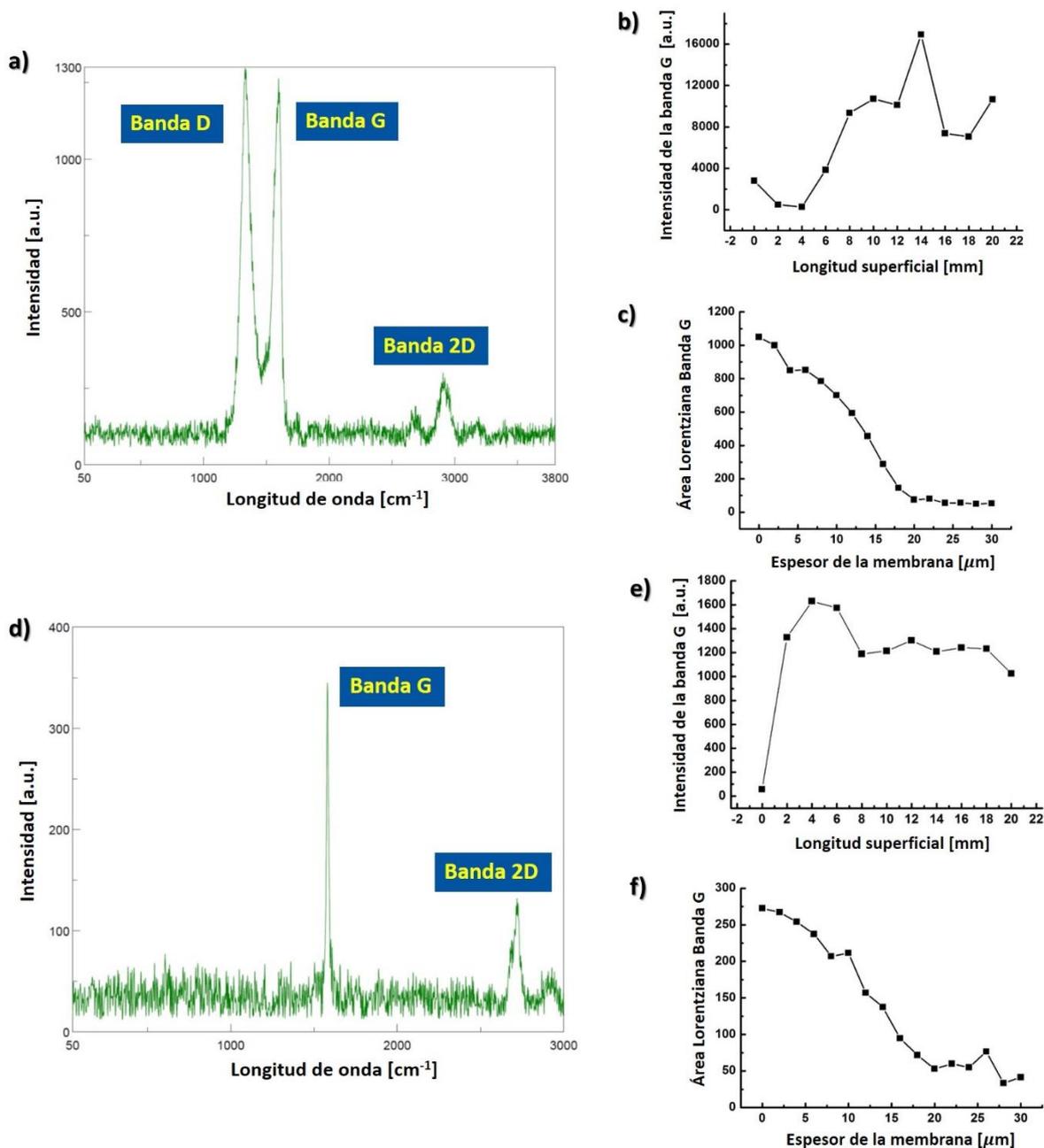
En la **Figura 16** se muestran los espectros de las membranas compuestas PCL/OG 2% Ox y 20% Ox simultáneamente con el espectro de la membrana de PCL. A  $3446\text{ cm}^{-1}$  (en las proximidades de  $3500\text{ cm}^{-1}$ ) aparecía un ligero pico debido a la vibración del grupo OH- procedente de la humedad (agua) que pueda quedar en las membranas.

A  $2944$  y  $2865\text{ cm}^{-1}$  se observan en todas las membranas dos picos característicos del polímero debidos a la vibración del enlace  $-\text{CH}_2-$ . A  $1722\text{ cm}^{-1}$  se aprecia un pico muy

pronunciado que representa el enlace éster (O-C=O) característico de la PCL. A partir de esa longitud de onda se aprecian numerosos picos en todos los espectros de las membranas. Son debidos a las vibraciones de los enlaces propios del polímero. Sin embargo no se aprecia ninguno de los picos característicos del OG, ni del enlace C=C característico de la vibración esquelética de los grupos no oxidados del OG a  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Esto puede ser debido a la baja concentración de los nanomateriales en la matriz polimérica. Por tanto, esta técnica analítica no resulta concluyente.

También se realizó un espectro Raman de ambas membranas compuestas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox para analizar la calidad del nanomaterial así como su distribución en la matriz polimérica, tanto en superficie como en espesor. Los resultados obtenidos de este análisis se recogen en la **Figura 17**.

En el espectro Raman de la superficie de la membrana PCL/OG 20% Ox (**Figura 17 a**) se observan dos picos muy prominentes. El primero corresponde a la banda D o banda de defectos (a  $1335\text{ cm}^{-1}$ ) que muestra las impurezas que presenta el grafeno, por la presencia de grupos oxigenados. El segundo pico corresponde a la banda G ( $1597\text{ cm}^{-1}$ ) propia del grafeno (modo de vibración primaria en el plano de grafeno). Ambas bandas coinciden con los resultados hallados para el OG en otros artículos científicos [34] y [35], por lo que se puede concluir que el OG con 20% de oxígeno se asemeja más a un óxido de grafeno, con numerosos defectos, que a un grafeno. Sin embargo, el espectro de las membranas PCL/OG 2% Ox (**Figura 17 b**) no presentan dicha banda D. Esto es debido a que el nanomaterial apenas presenta defectos y es un grafeno de alta calidad con una banda G ( $1588\text{ cm}^{-1}$ ) muy prominente, señal de estar suficientemente reducido.



**Figura 17.** (a) Espectro Raman y (b) distribución superficial y (c) en espesor del grafeno en la membrana PCL/OG 2% Ox; así como (d) espectro Raman y (e) distribución superficial y (f) en espesor del OG en la membrana PCL/OG 20% Ox.

Los resultados obtenidos sobre la distribución de los nanomateriales en la superficie de las membranas PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox (**Figura 17b y 17e**) muestran que la intensidad de la banda G del nanomaterial es más uniforme en las membranas del 2% Ox que en las otras. Por lo que el OG en las membranas de PCL/OG 20% Ox parece que tiende a formar aglomerados y no se distribuye de manera tan uniforme como el OG con 2% Ox. Esto se refleja en la diferencia de intensidad que presenta la banda G del OG a lo largo de la superficie de membrana (medidas de intensidad de la banda G tomadas

cada 2 mm). La formación de estos aglomerados se produce probablemente en la dispersión inicial del OG o durante la inversión de fases cuando el disolvente orgánico se evapora, tal como explican Shin et al. [36].

En cuanto a su distribución a lo largo del espesor de la membrana, ambos nanomateriales se distribuyen de forma similar (**Figura 17c y 17f**) teniendo más tendencia a permanecer en la superficie de la membrana.

Estos resultados comparados con los reportados en la bibliografía [2] se corresponden con algunas excepciones. Las membranas de PCL/OG son muy similares con las membranas PCL/OG 20% Ox en cuanto a su espectro Raman (bandas D y G) y a la distribución del OG a lo largo del espesor de la membrana. La única diferencia es su distribución en superficie, siendo más homogénea la de las membranas PCL/OG. Esto puede deberse a que la dispersión del OG 20% Ox en el disolvente no es tan homogénea como se esperaba, generándose más agregados de partículas. Si se comparan los resultados de las membranas PCL/rOG con las PCL/OG 2% Ox se ven claras diferencias. En estas primeras sí que aparece señal de la banda D en la sección transversal, por lo que el material es de peor calidad (peor reducido o se mantienen defectos estructurales en los enlaces del rOG imposible de reparar tras la reducción), pero apenas hay señal en la superficie (ni banda D ni G), lo que implica que el rOG de estas membranas tiene tendencia a migrar hacia el interior de la matriz polimérica.

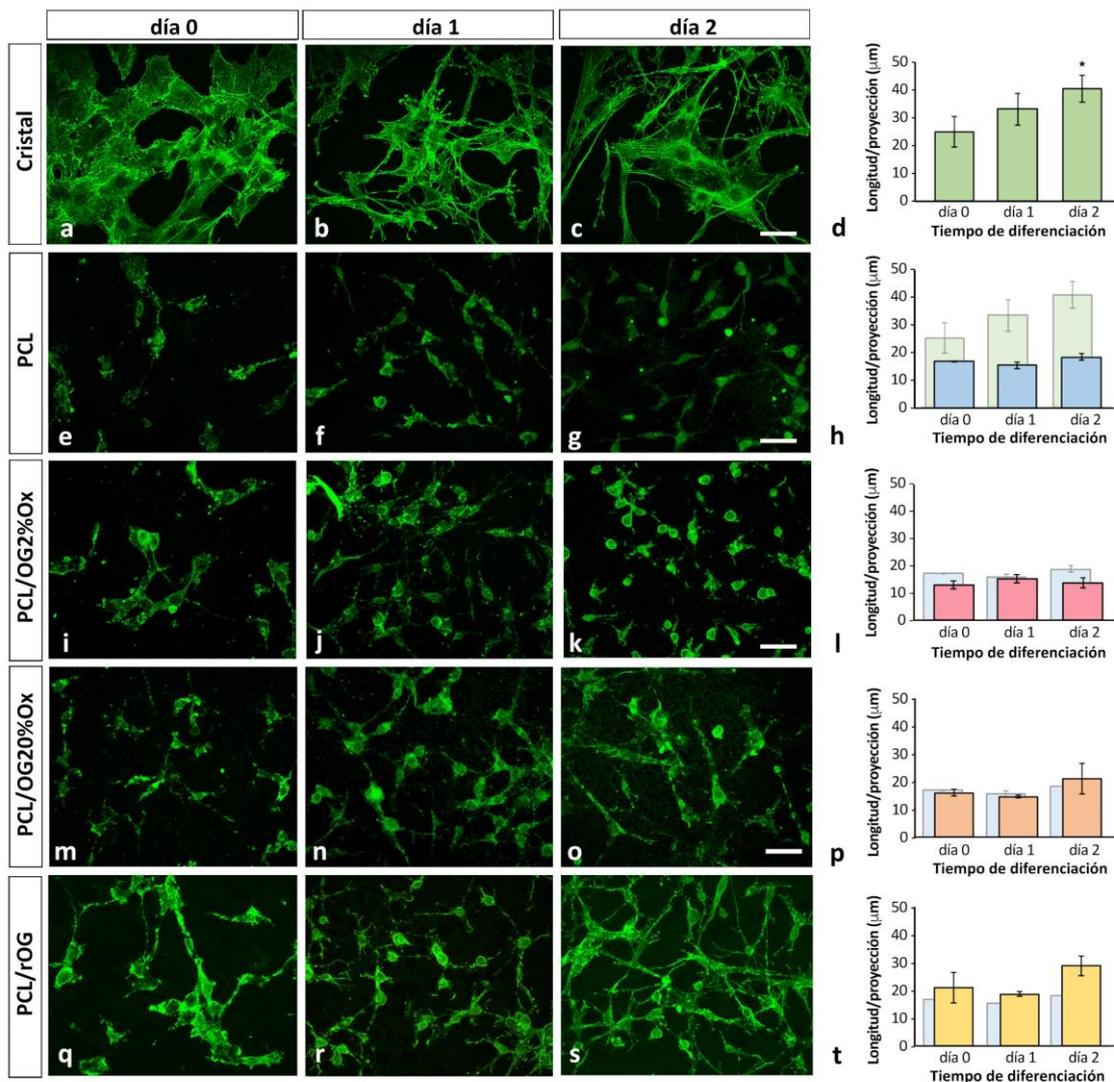
De los resultados anteriores se puede concluir lo siguiente:

1. La dispersión homogénea y uniforme de los nanomateriales de grafeno, sobre todo de aquellos con más contenido en grupos oxigenados, al ser introducidos en la matriz polimérica durante la inversión de fases es muy complicada y el proceso debe ser optimizado.
2. Tanto en las membranas PCL/OG 2% Ox como en las PCL/OG 20% Ox, los nanomateriales se localizan preferentemente en la superficie de las membranas, independientemente del grado de oxidación.

### 3.6 Efecto del contenido de oxígeno del OG sobre la diferenciación de células C6 a astrocitos

Uno de los objetivos del presente proyecto es estudiar la aplicabilidad de las membranas composite con nanomateriales basados en grafeno con distintos grados de oxidación como estructuras biopoliméricas aplicables a cultivos celulares *in vitro*. En particular, y dadas sus propiedades de conductividad eléctrica y funcionalidad biológica, los cultivos de células del tejido nervioso sobre dichas membranas podrían ver favorecido su desarrollo y diferenciación.

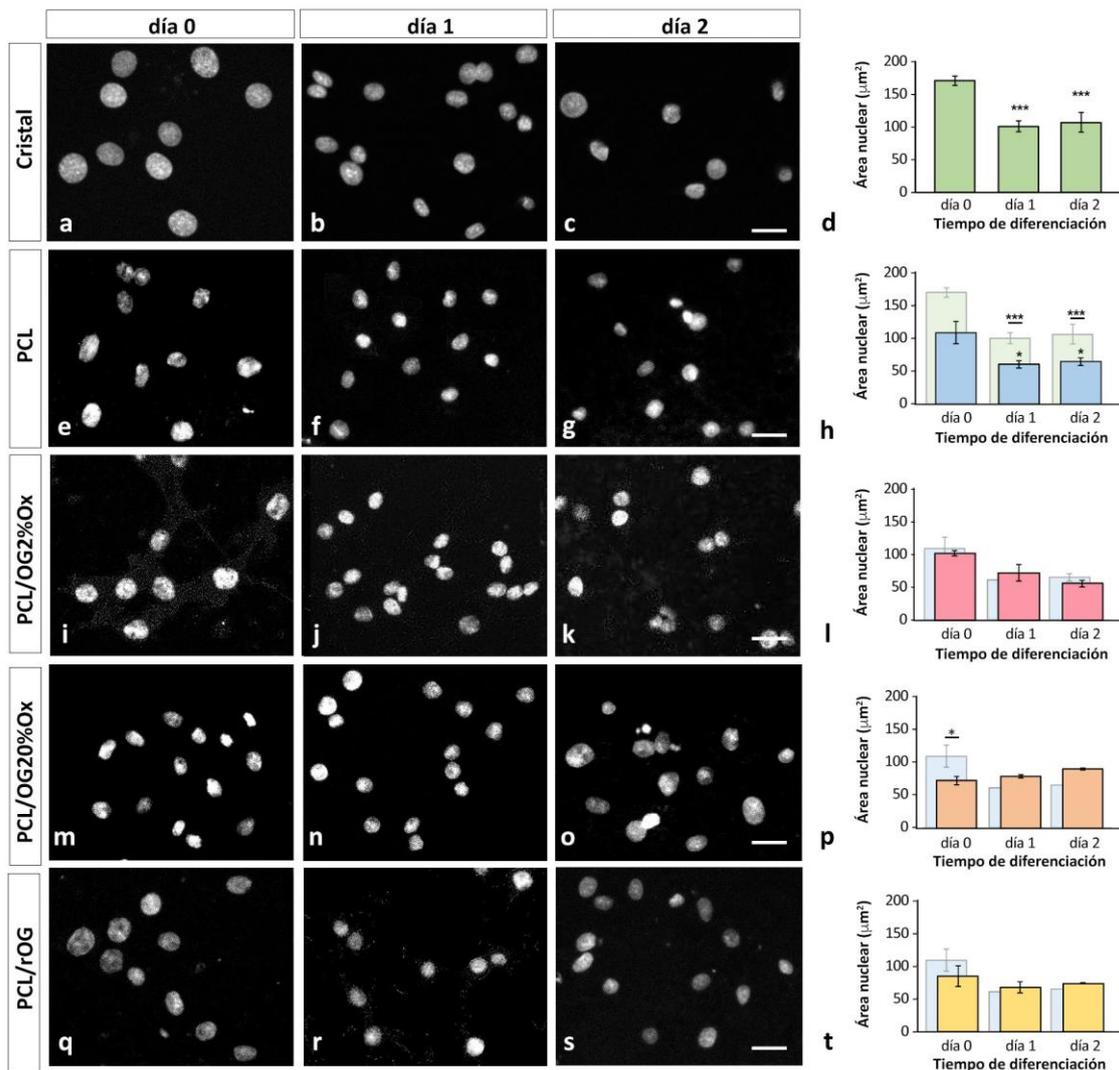
En primer lugar, quisimos evaluar si la presencia de nanomateriales basados en grafeno obtenidos por exfoliación anódica en membranas composite permitía la adhesión, crecimiento y diferenciación celular. Para ello, analizamos distintos estadios del proceso de diferenciación de células C6 a astrocitos utilizando cinco tipos de sustrato biopolimérico: i) cristal, ii) PCL, iii) PCL/OG 2% Ox, iv) PCL/OG 20% Ox y v) PCL/rOG. Utilizando el marcaje con Faloidina-FITC, nos planteamos realizar un estudio morfológico comparativo, ya que esta molécula, se une específicamente a los filamentos finos de actina de la corteza y permite visualizar el contorno celular. Como se observa en la **Figura 18**, las células C6 tienen capacidad de adherirse a los cinco tipos de sustratos, si bien mostraban diferencias morfológicas muy evidentes. En primer lugar, analizamos células subcultivadas sobre cristal (método habitual), que exhibían una morfología fusiforme con numerosas fibras de estrés, característica más propia de fibroblastos que de células gliales (**Figura 18a**). Cuando las células son expuestas a 1mM dbcAMP durante 24h y 48h se inducen cambios morfológicos asociados con la diferenciación a astrocitos evidenciados por la formación de prolongaciones o proyecciones citoplasmáticas. El análisis morfométrico de las proyecciones reveló que su longitud aumenta de manera progresiva y significativa tras 48h (**Figura 18b y 18c**). Sin embargo, la exposición de células C6 adheridas a membranas composite de PCL a 1mM dbcAMP no indujo el crecimiento de las proyecciones (**Figura 18e-h**). Resultados similares se obtuvieron cuando analizamos células adheridas a biopolímeros basados en membranas PCL/OG 2% OX (**Figura 18i-l**), PCL/OG 20% Ox (**Figura 18m-p**) o PCL/rOG (**Figura 18q-t**).



**Figura 18.** (a-t) Estudio morfológico de la longitud de las proyecciones en células C6 no-diferenciadas (día0), o diferenciadas durante 24h (día 1) y 48h (día 2). El marcaje de la F-Actina (verde) permite la medición de la longitud de las proyecciones de las células crecidas en los 5 tipos de sustrato indicados. Las barras representan la media  $\pm$  SD de la longitud de las proyecciones medidas en un mínimo de 30 células de cada imagen (n=3). Escala 30 $\mu$ m. \*p<0.05.

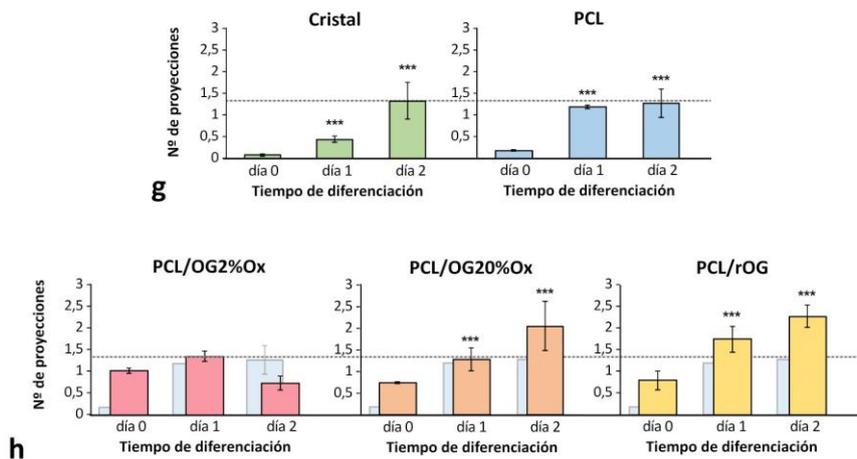
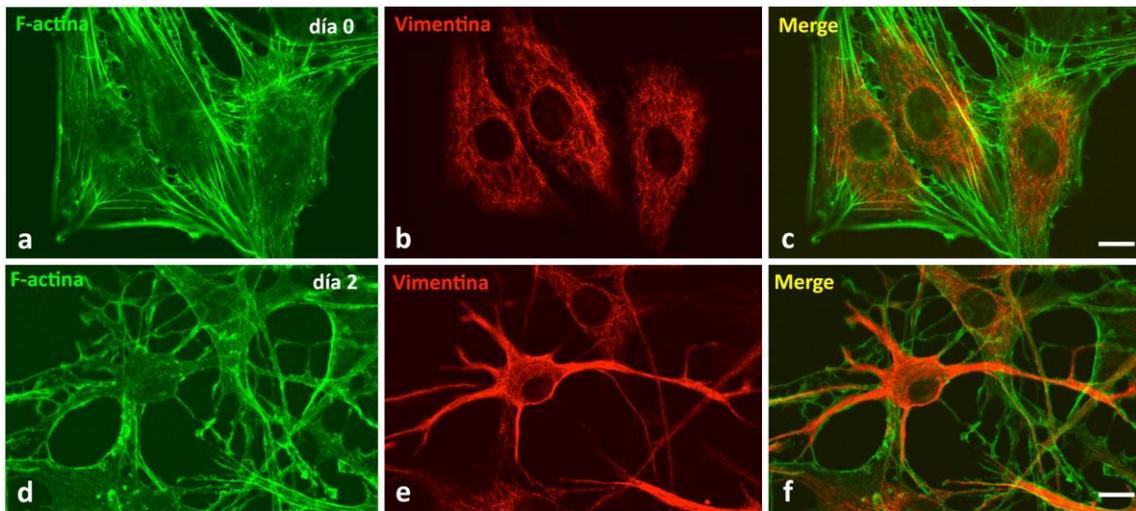
Durante los estudios morfométricos pudimos apreciar que las células C6 diferenciadas sobre membranas presentaban un tamaño menor. Es bien conocido que asociado a procesos de diferenciación se producen cambios en el tamaño nuclear celular, consecuentes a la reorganización de la cromatina y a cambios en la expresión génica [37]. Por esta razón realizamos un estudio cuantitativo comparativo del tamaño nuclear durante la diferenciación de las células C6 adheridas a los distintos sustratos. En la **Figura 19**, se muestran microfotografías del núcleo celular de células C6 obtenido por el marcaje con Hoechst, un colorante fluorescente que se une directamente al DNA. El estudio morfométrico del área nuclear muestra como 48 horas después de la inducción

de la diferenciación, las células C6 crecidas sobre cristal experimentan una significativa reducción de su tamaño nuclear (**Figura 19a-d**). Por su parte, confirmamos que la adhesión de las células C6 sobre las membranas de PCL (día 0) causaba la reducción de su tamaño nuclear con respecto al cristal (**Figura 19e**). Destacar que el tamaño nuclear se mantenía durante todo el proceso de diferenciación (**Figura 19f-h**). El análisis del efecto de las distintas categorías de OG en las membranas de PCL reveló que únicamente la presencia de OG 20% Ox potenciaba una reducción del tamaño nuclear más significativa que la observada en membranas PCL (**Figura 19i-t**).



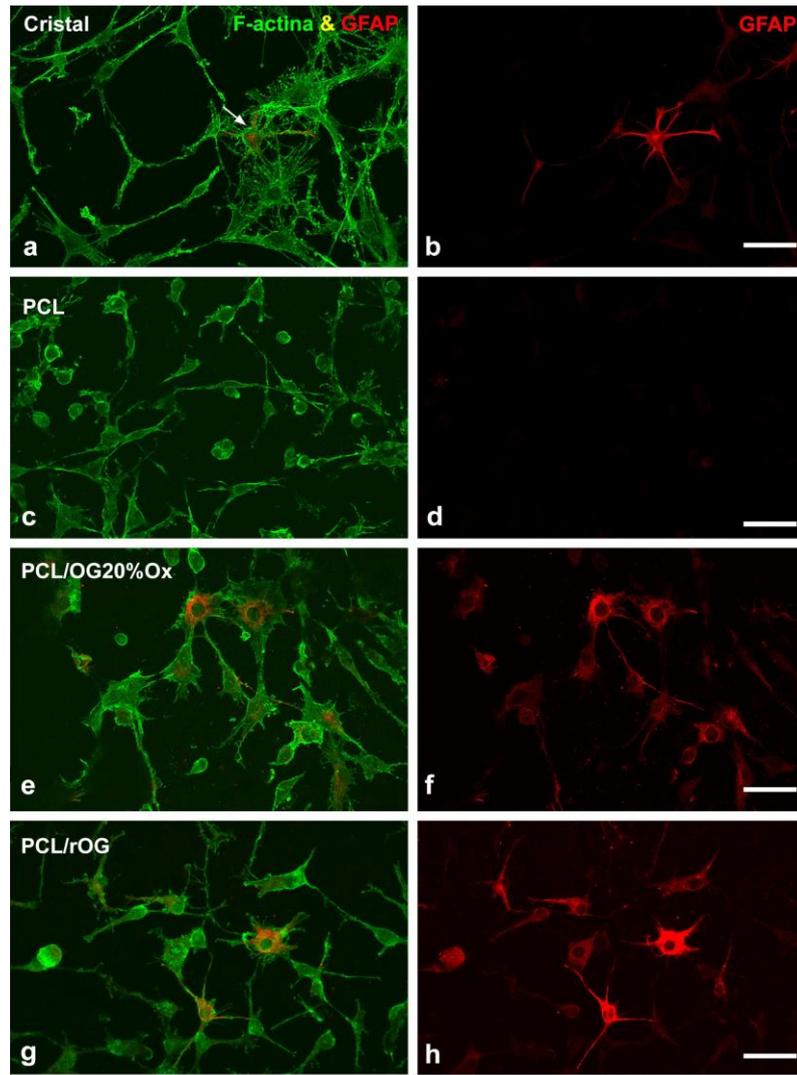
**Figura 19. (a-t)** Estudio morfométrico del área nuclear en células C6 no-diferenciadas (día 0), o diferenciadas durante 24h (día 1) y 48h (día 2). El marcaje con Hoechst (blanco) permite medir el área nuclear obtenida del plano focal ecuatorial de células C6 crecidas en los 5 tipos de sustrato indicados. Las barras representan la media  $\pm$  SD del área nuclear medida en un mínimo de 30 células de cada imagen (n=3). Escala 20µm. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

A continuación, quisimos analizar si la presencia de los distintos tipos de OG en las membranas PCL influía sobre otro factor morfológico relacionado con la diferenciación astrocítica como es el número de proyecciones. Para este análisis realizamos la inmunodetección de filamentos intermedios de Vimentina, presentes en todas las células, con anticuerpos específicos que reconocen esta proteína en combinación con el marcaje de la corteza celular con Faloidina. Con esta técnica de doble marcaje permite visualizar distintos componentes del citoesqueleto celular y, en particular, la región de donde emergen las proyecciones para su contaje. En la **Figura 20** se observan la morfología típica de células C6 no diferenciadas (d0) (**Figura 20a-c**) o con la morfología estrellada típica de los astrocitos 48 h post-diferenciación (día 2) (**Figura 20e-f**).



**Figura 20.** (a-h) Estudio cuantitativo del número de proyecciones por células C6 no-diferenciadas (día 0), o diferenciadas durante 24h (día 1) y 48h (día 2). (a-f) El doble marcaje de F-Actina (verde) y Vimentina (rojo) permite la cuantificación del número de proyecciones emitidas por las células. Las imágenes son células C6 a día 0 (a-c) y 2 días post-diferenciación (d-f) adheridas a cristal. (g-h) Las barras representan la media  $\pm$  SD del número de proyecciones medidas en un mínimo de 30 células de cada imagen (n=3). Escala 10 $\mu$ m. \* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.0005.

El análisis estadístico del número medio de proyecciones en células C6 durante la diferenciación reveló que, tanto en cristal como en membranas de PCL, se forman aprox. 1,5 proyecciones por célula. En el caso de las membranas PCL/OG 2% Ox no se induce la formación de proyecciones (dato no mostrado). Sin embargo, tanto la presencia de OG con 20% de oxígeno como de rGO en las membranas de PCL estimula de manera significativa la formación de proyecciones (**Figura 20 g y h**).

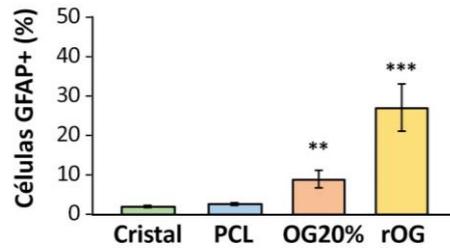


**Figura 21. (a-h)** Estudio cuantitativo del porcentaje de células C6 GFAP-positivas 48h post-diferenciación sobre los sustratos indicados. El doble marcaje de F-Actina (verde) y GFAP (rojo) permite cuantificar la proporción de células positivas al marcaje para GFAP. Escala 30 $\mu$ m.

Como último objetivo de este bloque de resultados quisimos comprobar si los cambios morfológicos asociados al proceso de diferenciación de las células C6 se acompañaban de cambios en la expresión génica. La activación de genes específicos de astrocitos del tejido nervioso, es el ensayo de validación adecuado para determinar si el proceso de

diferenciación ha sido específico. Por ello, nos planteamos analizar la expresión del gen GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein), mediante el inmunomarcaje de la proteína que codifica. GFAP forma filamentos intermedios en las células gliales, principalmente los astrocitos, y tiene como función principal dar soporte y rigidez a la membrana celular. El doble marcaje de los neurofilamentos de GFAP y de la F-Actina de la corteza celular nos permitió visualizar las células C6 que han completado el proceso de diferenciación a astrocito. En la **Figura 21** podemos ver imágenes panorámicas de cultivos de células C6 (48h post-diferenciación) sobre las que se realizó el conteo de la proporción de células GFAP-positivas.

El análisis comparativo en los distintos sustratos de la proporción de células GFAP-positivas nos revela que el crecimiento sobre membrana de PCL sin grafeno no induce la expresión de GFAP si lo comparamos con el cristal. Sin embargo, cuando las membranas contenían OG 20% Ox o rGO, el número de células que expresaban el marcador de diferenciación astrocítica aumentaba de manera significativa llegando a valores cercanos al 30% (**Figura. 22**). Estos resultados son similares a los observados en Sanchez-González et al. [2] en donde la respuesta de diferenciación de células neuronales progenitoras de origen humano en células neuronales era mucho más acusada en las membranas de PCL/OG y PCL/rOG frente a las membranas de PCL sin nanomateriales. Además las membranas de PCL/rOG presentaban mejoras significativas tanto en las etapas de diferenciación, como después en el estudio de la funcionalidad neuronal en la fase de maduración. Sin embargo, aunque en aquel trabajo se atribuye la mejor respuesta celular de las PCL/rOG a la mayor conductividad del rOG frente al OG, los resultados en este estudio, revelan que el OG 2% Ox con una mayor conductividad eléctrica que el rOG, muestra respuestas de diferenciación mucho peores, por lo que la hipótesis de que las propiedades electro-conductoras de los nanomateriales están detrás de la mejora en la respuesta de diferenciación y funcionalidad neuronales debe ser revisada.



**Figura 22.** Representación en barras del análisis estadístico de la proporción de células C6 GFAP-positivas diferenciadas sobre los sustratos indicados. Cada barra representa la media  $\pm$  SD del porcentaje de células GFAP-positivas medidas en tres imágenes diferentes (n=3). \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ .

En su conjunto, los resultados obtenidos en este estudio revelan que, de todas las configuraciones analizadas, las membranas composite PCL/OG 20% Ox y sobre todo PCL/rOG tienen propiedades biopoliméricas capaces que permitir un proceso de diferenciación en células C6 a astroglia del tejido nervioso según los distintos parámetros analizados. El crecimiento sobre dichas membranas induce la reducción del tamaño nuclear, incrementa el número de proyecciones y su longitud, y causa la activación de genes específicos del citoesqueleto de los astrocitos.

#### 4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han caracterizado físico-químicamente y morfológicamente las membranas compuestas de PCL/OG con 2% y 20% de oxígeno (PCL/OG 2% Ox y PCL/OG 20% Ox), además de estudiar su degradación térmica y sus propiedades de transporte de nutrientes además de estudiar el efecto de los diferentes nanomateriales sobre la inducción a la diferenciación en astrocitos de la línea celular C6.

Mediante la técnica de inversión de fases se han sintetizado las membranas compuestas de PCL/OG utilizando OG sintetizado mediante un novedoso método de exfoliación anódica, desarrollado por el grupo de Materiales Carbonáceos (INCAR-CSIC), con el que se consigue controlar el grado de oxidación de los nanomateriales de grafeno pudiéndose obtener unos ratios O/C muy bajos y nanomateriales con características de conductividad eléctrica similares a la calidad de grafeno obtenido por la técnica de CVD. Mediante microscopía SEM y técnicas gravimétricas se ha realizado un análisis morfológico de ambas membranas. Ambas presentan una porosidad elevada, superficial y transversal, con una alta interconexión entre los poros y tamaño de poro uniforme en todo el espesor, siendo estos parámetros mayores en las membranas PCL/OG 2% Ox lo que está en acuerdo con las mayores propiedades de flujo de agua observadas experimentalmente para estas membranas en comparación con las PCL/OG 20% Ox.

El análisis de otras propiedades, como el ángulo de contacto, la resistividad eléctrica, análisis termogravimétrico y espectroscopia FTIR, no revelan diferencias significativas entre estas membranas composite y las membranas de PCL sin aditivar con nanomateriales.

Por último, mediante espectroscopia Raman, se caracterizó la calidad de la dispersión del OG así como su distribución y presencia en la matriz polimérica. Este análisis suministró información clave para analizar la influencia de los nanomateriales en los mecanismos de diferenciación celular. El espectro Raman de la membrana PCL/OG2% Ox no presenta banda D (asociada a defectos) y posee una banda G y una banda de resonancia 2D prístinas, consecuencia de un material grafitico de alta calidad. Las membranas PCL/OG 20% Ox presentan una banda D muy prominente, material con muchos defectos, sin embargo inducen mejor la diferenciación celular. El grado de

diferenciación se ha cuantificado realizando un inmunomarcaje con anticuerpos anti-GFAP, que en las fotografías de microscopía confocal se traduce en un aumento en el porcentaje de células que expresan esa proteína, únicamente sintetizada por astrocitos. Además se han cuantificado otros parámetros de diferenciación como la reducción del área nuclear y el número y longitud de las proyecciones emitidas, todos ellos mejores en las membranas del PCL/OG 20% Ox. Los mejores resultados, asociados a la diferenciación hacia astrocitos (expresión de la proteína GFAP), número de proyecciones y disminución del tamaño nuclear, se obtuvieron con las membranas PCL/rOG testadas por Sánchez-González [et al.] en su artículo [2]. Las membranas PCL/rOG presentan una banda D bastante pronunciada en su espectro Raman y aun así induce mejor la diferenciación que el OG con 2% Ox que apenas contiene defectos en su estructura.

A la vista de los resultados obtenidos, a la hora de inducir la diferenciación de las C6 hacia células gliales como los astrocitos, no las influyen tanto las propiedades eléctricas del nanomaterial sino que se trata más de una cuestión de la química intrínseca del material. Se observa que la presencia de defectos como grupos oxigenados o particularmente la presencia de huecos/defectos de enlace en la estructura del anillo carbonado del grafeno, induce mejor la diferenciación de estas células. Los trabajos futuros deberían ir encaminados a comprender mejor los mecanismos que estas características intrínsecas de los nanomateriales activan sobre la respuesta de diferenciación celular neuronal.

## 5. ANEXOS

En este apartado se recoge la ficha técnica de la casa comercial ATCC (American Type Culture Collection) que suministra las células C6.



Product Sheet

### C6 (ATCC® CCL-107™)

Please read this FIRST

Storage Temp.  
**liquid nitrogen  
vapor phase**

Biosafety Level  
**1**

#### Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

#### Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 2.5%; horse serum to a final concentration of 15%.

#### Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: C6 (ATCC® CCL-107™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

Page 1 of 3

#### Description

**Organism:** *Rattus norvegicus*, rat  
**Tissue:** brain  
**Disease:** glioma  
**Cell Type:** glial cell  
**Morphology:** fibroblast  
**Growth Properties:** adherent

**Cytogenetic Analysis:** Stemline number is diploid. Karyotype is stable within the stemline number and is that of a normal male. Three cells with breaks; one with a secondary constriction, one with a dicentric, one with a rearrangement and four with terminal or centromere associations. Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the literature for some cell lines.

#### Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

#### SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

#### Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

#### Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes. Discard supernatant.
4. Resuspend the cell pellet with the recommended complete medium and dispense into a 25 cm<sup>2</sup> culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

#### Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information), grown, and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. If the cells are still attached, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. If the cells are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL



Product Sheet

C6 (ATCC® CCL-107™)

Please read this FIRST

 Storage Temp.  
**liquid nitrogen  
vapor phase**

---

 Biosafety Level  
**1**

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 2.5%; horse serum to a final concentration of 15%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: C6 (ATCC® CCL-107™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

of this medium and add to 25 cm<sup>2</sup> flask. Incubate at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Volumes are given for a 75 cm<sup>2</sup> flask. Increase or decrease the amount of dissociation medium needed proportionally for culture vessels of other sizes.

1. Remove and discard culture medium.
2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor.
3. Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).  
**Note:** To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
6. Incubate cultures at 37°C.

**Subcultivation Ratio:** A subcultivation ratio of 1:2 to 1:3 is recommended

**Medium Renewal:** 2 to 3 times per week



Cryopreservation Medium

Complete culture medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC® Catalog No. 4-X.



Comments

S-100 production increases ten fold as cells grow from low density to confluency.



References

References and other information relating to this product are available online at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)



Product Sheet

## C6 (ATCC® CCL-107™)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).  
© ATCC 2018. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [08/17]

Please read this FIRST

A black rectangular box containing safety information. At the top left is a white thermometer icon. To its right, the text reads "Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase". A horizontal dotted line separates this from the bottom section. At the bottom left is a white biohazard icon. To its right, the text reads "Biosafety Level 1".

### Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

### Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 2.5%; horse serum to a final concentration of 15%.

### Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: C6 (ATCC® CCL-107™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

Page 3 of 3

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] NIH (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Department of Health and Human Services*. Consulta: 01-2019. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
- [2] Sánchez-González, S. *et al.* (2018) 'Evidences of the Effect of GO and rGO in PCL Membranes on the Differentiation and Maturation of Human Neural Progenitor Cells', *Macromolecular Bioscience*. doi: 10.1002/mabi.201800195.
- [3] Kenry *et al.* (2018) 'When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 155, pp. 236–250. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.004.
- [4] Park, S. Y. *et al.* (2011) 'Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene', *Advanced Materials*, 23(36), pp. 263–267. doi: 10.1002/adma.201101503.
- [5] Akhavan, O. *et al.* (2016) 'Rolled graphene oxide foams as three-dimensional scaffolds for growth of neural fibers using electrical stimulation of stem cells', *Carbon*. Elsevier Ltd, 97, pp. 71–77. doi: 10.1016/j.carbon.2015.06.079.
- [6] Diban, N. *et al.* (2017) 'Facile fabrication of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering', *Journal of Membrane Science*. doi: 10.1016/j.memsci.2017.06.052.
- [7] Diban, N. *et al.* (2015) 'Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Films with Favourable Properties for Neural Cell Growth', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(23), pp. 2743–2749. doi: 10.2174/1568026614666141215153932.
- [8] ORIOL, G. G., RICARD, G.-V. and MARTA, G. (2012) 'Membranas para la fotosíntesis artificial', *Seguridad y medio ambiente*, 126, pp. 48–57. Consulta: 12-2019. Disponible en: [https://www.fundacionmapfre.org/documentacion/publico/i18n/catalogo\\_imagenes/grupo.cmd?path=1070610](https://www.fundacionmapfre.org/documentacion/publico/i18n/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1070610).
- [9] Martínez-Ramos, C. *et al.* (2008) 'Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates', *Tissue engineering. Part A*, 14(8), pp. 1365–1375. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0295.
- [10] Enderle, J. and Bronzino, J. (2012) 'Biomedical Engineering', in *Introduction to Biomedical Engineering*. Third edit. Oxford: Elsevier Inc, pp. 23–28.
- [11] Akhavan, O. *et al.* (2014) 'Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheets', *Carbon*. Elsevier Ltd, 66(Cvd), pp. 395–406. doi: 10.1016/j.carbon.2013.09.015.
- [12] Hummers, W. . and Offeman, R. . (1958) 'Preparation of Graphitic Oxide', *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), p. 1339. doi: 10.1021/ja01539a017.
- [13] Ribao, P., Rivero, M. J. and Ortiz, I. (2017) 'TiO<sub>2</sub> structures doped with noble metals and/or graphene oxide to improve the photocatalytic degradation of dichloroacetic acid', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, 24(14), pp. 12628–12637. doi: 10.1007/s11356-016-7714-x.

- [14] Munuera, J. M. *et al.* (2018) 'High quality, low-oxidized graphene via anodic exfoliation with table salt as an efficient oxidation-preventing co-electrolyte for water/oil remediation and capacitive energy storage applications', *Applied Materials Today*, 11, pp. 246–254. doi: 10.1016/j.apmt.2018.03.002.
- [15] Ruvalcaba, J. L. (no date) *Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), ANDREAH (Análisis No Destructivo para el Estudio in situ del Arte, la Arqueología y la Historia*. Consulta: 01-2019. Disponible en: [http://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas\\_equipos/ftir.html](http://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas_equipos/ftir.html).
- [16] Thermofisher Scientific. *Conceptos básicos de FTIR*. Consulta:01-2019. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>.
- [17] Chandler, D. . (2013) *Better understanding of how surfaces attract or repel water could improve everything from power plants to ketchup bottles*, MIT (Massachusetts Institute of Technology) News. Consulta: 12-2018. Disponible en: <http://news.mit.edu/2013/hydrophobic-and-hydrophilic-explained-0716>.
- [18] ATRIA Innovation (2016) *¿Qué es el ángulo de contacto?*. Consulta: 01-2019. Disponible en: <http://atriainnovation.com/que-es-el-angulo-de-contacto/>.
- [19] Dean, D. *Thermal Gravimetric Analysis, University of Alabama at Birmingham*. Consulta: 01-2019. Disponible en: [https://www.uab.edu/engineering/home/images/downloads/TGA\\_UAB\\_TA\\_MAY\\_absolute\\_final\\_2014.pdf](https://www.uab.edu/engineering/home/images/downloads/TGA_UAB_TA_MAY_absolute_final_2014.pdf).
- [20] Heaney, M. B. (2003) 'Electrical conductivity and Resistivity', in Webster, J. G. (ed.) *Electrical Measurement, Signal Processing and Displays*, pp. 1–11.
- [21] BIOSLab (2019) *Niveles de bioseguridad, Universidad Complutense de Madrid*. Consulta: 12-2018. Disponible en: <https://www.visavet.es/es/bioslab/niveles-de-bioseguridad.php>.
- [22] Meg, M., Molist, P. and Pombal, M. A. (2017) 'Tipos celulares. ASTROCITO', in *Atlas de Histología Vegetal y Animal*. Universidad de vigo.
- [23] Ryan, J. (2008) 'Evolution of Cell Culture Surfaces', *BioFiles*, 21.
- [24] GORI, G. B. (1964) 'Trypsinization of Animal Tissues for Cell Culture: Theoretical Considerations and Automatic Apparatus.', *Applied microbiology*, 12(2), pp. 115–21. Consulta: 12-2018. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14131358%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1058079>.
- [25] Tomasi, V. H. (2009) *Fijadores Químicos, Fijación de Muestras Biológicas*. Consulta:01-2019. Disponible en: <http://educacionhistotecnologiafijaciondos.blogspot.com>.
- [26] Tejeda, A., Montesinos, R. M. and Guzmán, R. (2011) 'Rompimiento de Células', in *Bioseparaciones*. Segunda ed. México: Pearson Educación, pp. 165–222. Consulta: 01-2019. Disponible en: [http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Rompimiento\\_Celular\\_Tejeda\\_Bioseparaciones.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Rompimiento_Celular_Tejeda_Bioseparaciones.pdf).

- [27] Johnson, M. (2013) 'Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More', *Labome. The world of laboratories*. doi: 10.13070/mm.es.3.163.
- [28] Kumar, S. *et al.* (2015) 'Chemical Functionalization of Graphene To Augment Stem Cell Osteogenesis and Inhibit Biofilm Formation on Polymer Composites for Orthopedic Applications', *ACS: Applied Materials and Interfaces*, 7(5), pp. 3237–3252. doi: 10.1021/am5079732.
- [29] Stankovich, S. *et al.* (2007) 'Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide', *Carbon*. Pergamon, 45(7), pp. 1558–1565. doi: 10.1016/J.CARBON.2007.02.034.
- [30] Unger, M., Vogel, C. and Siesler, H. W. (2010) 'Molecular weight dependence of the thermal degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone): A thermogravimetric differential thermal fourier transform infrared spectroscopy study', *Applied Spectroscopy*. doi: 10.1366/000370210791666309.
- [31] Shen, J. *et al.* (2009) 'Synthesis of amphiphilic graphene nanoplatelets', *Small*. doi: 10.1002/sml.200800988.
- [32] Kaloustian, J., Pauli, A. M. and Pastor, J. (1991) 'DTA identification of polycaprolactone', *Journal of thermal analysis*, 37, pp. 1767–1773.
- [33] Balu, R. *et al.* (2011) 'Electrospun Polycaprolactone/Poly(1,4-butylene adipate-co-polycaprolactam) Blends: Potential Biodegradable Scaffold for Bone Tissue Regeneration', *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 1(1), pp. 30–39. doi: 10.1166/jbt.2011.1004.
- [34] Shin, Y. *et al.* (2016) 'Synthesis and characterization of composite membranes made of graphene and polymers of intrinsic microporosity', *Carbon*. The Authors, 102, pp. 357–366. doi: 10.1016/j.carbon.2016.02.037.
- [35] Johra, F. T., Lee, J. W. and Jung, W. G. (2014) 'Facile and safe graphene preparation on solution based platform', *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, 20(5), pp. 2883–2887. doi: 10.1016/j.jiec.2013.11.022.
- [36] Thema, F. T. *et al.* (2013) 'Synthesis and characterization of graphene thin films by chemical reduction of exfoliated and intercalated graphite oxide', *Journal of Chemistry*, (June 2015). doi: 10.1155/2013/150536.
- [37] Jevtić, P. *et al.* (2014) 'Sizing and shaping the nucleus: Mechanisms and significance', *Current Opinion in Cell Biology*, 28(1), pp. 16–27. doi: 10.1016/j.ceb.2014.01.003.