

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS  
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



***Trabajo Fin de Grado***

**Síntesis, caracterización y estudio de biocompatibilidad de membranas de poliacrilonitrilo funcionalizadas con altas concentraciones de grafeno en cultivos celulares**

**(Synthesis, characterization and study of biocompatibility of polyacrylonitrile membranes functionalized with high concentrations of graphene in cell cultures)**

Para acceder al Título de

***Graduada en Ingeniería Química***

Autor: Elena Fuente Moya

<b>TÍTULO</b>	<b>Síntesis, caracterización y estudio de biocompatibilidad de membranas de poliacrilonitrilo funcionalizadas con altas concentraciones de grafeno en cultivos celulares</b>		
<b>AUTOR</b>	<b>Elena Fuente Moya</b>		
<b>DIRECTOR/CODIRECTOR</b>	<b>Nazely Diban-Ibraim Gómez / Olga Tapia Martínez</b>		
<b>TITULACIÓN</b>	<i>Grado en Ingeniería Química</i>	<b>FECHA</b>	11-09-2019

## **PLABRAS CLAVE**

Poliacrilonitrilo, grafeno, ingeniería tisular, cultivos celulares, biocompatibilidad, MCF7, NSC34.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La ingeniería tisular es la rama de bioingeniería que estudia la incorporación de biomateriales y células para regenerar los tejidos y órganos total o parcialmente dañados [1]. La función de los soportes es favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Deben ser estructuras biocompatibles y biodegradables, cuya superficie y propiedades de transporte simulen el tejido en el que vaya a ser insertado con el fin de mejorar la eficacia y funcionalidad de la construcción de este [2].

Debido a la alta permeabilidad hidráulica que poseen las membranas de poliacrilonitrilo (PAN) [3] proporciona una mejora en la transferencia de masa de nutrientes y metabolitos a las células y la eliminación de catabolitos, se puede afirmar que estas membranas sintéticas son un apto candidato para ser usadas como soporte en el cultivo in vitro de tejidos en biorreactores para su utilización en el ámbito de ensayo clínico.

En el presente trabajo se han sintetizado membranas planas porosas de PAN funcionalizadas con altas concentraciones de grafeno contenido en la disolución polimérica (0, 2, 10 y 15% wt, dando lugar a las membranas PAN/G0, PAN/G2, PAN/G10 y PAN/G15 respectivamente), con un contenido de PAN de 10% wt en la disolución y N-metilpirrolidona (NMP) como disolvente. El método de síntesis empleado ha sido la inversión de fases mediante el proceso de casting, utilizando como coagulante una disolución agua/NMP al 80/20% v/v. Se han analizado las posibles mejoras en sus propiedades, caracterizando su morfología, composición química y analizando sus propiedades hidráulicas, eléctricas y térmicas. Además, se han realizado ensayos de adhesión, diferenciación, citotoxicidad y análisis morfológico para evaluar sus propiedades como soporte en diferentes líneas celulares.

## **RESULTADOS**

Se observó que una a mayor concentración de grafeno las superficies de las membranas se volvían más lisas y obtenían una porosidad superior en la sección transversal ( $47,9 \pm 9,6\%$ ). Las membranas sin funcionalizar PAN/G0 destacaron por sus propiedades hidráulicas, obteniendo el valor más alto  $1205 \pm 353$  L/h·m<sup>2</sup>·bar, que al ir aumentando

la concentración de grafeno hasta las membranas PAN/G15, se reducía progresivamente hasta  $579 \pm 88$  L/h·m<sup>2</sup>·bar. Los resultados de espectroscopia FTIR y de propiedades térmicas mediante TGA no dieron lugar a la observación de variaciones significativas entre las membranas sin funcionalizar y las funcionalizadas con grafeno, aunque si se observaron que las membranas PAN/G10 poseían un óptimo de las propiedades eléctricas en términos de conductividad y permitividad dieléctrica.

En los resultados de biocompatibilidad, se destaca que las membranas PAN/G10 como soporte para las células C6, procedentes de un tumor cerebral de rata, inhibe la diferenciación de las células C6 a astrocitos. Las membranas PAN/G10 como soporte para las células NSC34 procedentes de cáncer de células nerviosas de rata y las MCF7 de cáncer de mama, inhibe su proliferación y las reagrupa formando "islotos celulares".

## CONCLUSIONES

Analizando los resultados obtenidos se puede afirmar que la funcionalización de las membranas de PAN con altas concentraciones de grafeno provoca una mejora en las propiedades eléctricas y térmicas de las membranas, además de favorecer una alta porosidad transmembranal y una superficie de membranas más lisa y uniforme.

Según los resultados de los cultivos celulares, las membranas PAN/G inhiben la diferenciación de las células C6 a astrocitos, no son buenos soportes para la regeneración del tejido neuronal. Como soporte para las células MCF7 y NSC34, evita su proliferación y las reagrupa en "islotos celulares" a través de un mecanismo que implica la formación de uniones adherentes típicas de los tejidos epiteliales.

Se propone como futuros trabajos el estudio de la formación de estos "islotos celulares epiteliales" en otras líneas celulares de cáncer e investigar el mecanismo molecular que subyace en esta alteración del destino celular.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] NIH (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering). Tissue Engineering and Regenerative Medicine. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>

[2] Salehi-Nik, N et al. 2013. Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. BioMed Research Internationa (ID 762132). Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/762132>

[3] REYERO, J. 2017. *Membranas de Poliacrilonitrilo funcionalizadas con Óxido de Grafeno para su aplicación en la regeneración de tejido neuronal*. Diban, N.; Sánchez, S. (dirs.). Trabajo Fin de Grado. Disponible en UCrea: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/12132>

<b>TÍTULO</b>	<b>Synthesis, characterization and study of biocompatibility polyacrylonitrile of membranes functionalized with high concentrations of graphene in cell cultures</b>		
<b>AUTOR</b>	<b>Elena Fuente Moya</b>		
<b>DIRECTOR/CODIRECTOR</b>	<b>Nazely Diban-Ibraim Gómez / Olga Tapia Martínez</b>		
<b>TITULACIÓN</b>	<i>Grado en Ingeniería Química</i>	<b>FECHA</b>	11-julio-2019

## KEYWORDS

Polyacrylonitrile, graphene, tissue engineering, cell cultures, biocompatibility, MCF7, NSC34.

## SCOPE

The tissue engineering is the field of bioengineering that studies the incorporation of biomaterials and cells to regenerate tissues and organs totally or partially damaged [1]. The function of the scaffolds is to assist cell adhesion, proliferation and differentiation. They must be biocompatible and biodegradable structures whose surface and transport properties simulate the tissue in which they will be inserted in order to improve the efficiency and functionality of the construction of this [2].

Due to the high hydraulic permeability of the polyacrylonitrile membranes (PAN) [3] which provides an improvement in the mass transfer of nutrients and metabolites to the cells and the elimination of catabolites, it can be affirmed that these synthetic membranes are a suitable candidate to be used as scaffold in the in vitro culture of tissues in bioreactors for use in the clinical trial scope.

In this work have been synthesized flat porous PAN membranes functionalized with high concentrations of graphene contained in the polymer solution (0, 2, 10 and 15% wt, giving rise to PAN/G0, PAN/G2, PAN/G10 and PAN/G15 membranes, respectively), with a PAN content of 10% wt in the polymeric solution and N-methylpyrrolidone (NMP) as solvent. The method of synthesis used was the phase inversion by the casting process, using as coagulant a water/NMP solution at 80/20% v/v. The possible improvements of properties have been analysed by morphology characterization, chemical composition, and analyzing their hydraulic, electrical and thermal properties. Besides, adhesion, differentiation, cytotoxicity assays and morphological analysis have been performed to evaluate their properties like a scaffold for different cell lines.

## RESULTS

It has been observed that a higher concentration of graphene the membrane surfaces became more smooth and obtained a higher porosity at cross section ( $47,9 \pm 9,6\%$ ). The non functionalized membranes PAN/G0 stood out for their hydraulic properties, obtaining the highest value  $1205 \pm 353 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2\cdot\text{bar}$ , which as the concentration of

graphene was increased until PAN/G15 membranes, it was reduced progressively to  $579 \pm 88 \text{ L / h} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{bar}$ . The FTIR spectroscopy results and thermal properties by TGA did not produce significant variation between the non functionalized membranes and functionalize membranes with graphene, although it was observed that PAN/G10 membranes had an optimum of the electrical properties in terms of conductivity and dielectric permittivity.

At biocompatibility results, PAN/G10 membrane stand out as scaffold for the C6 cell, coming from a rat brain tumour, it inhibits the C6 cell differentiation to astrocytes. PAN/G10 membranes like scaffolds for the NSC34 cell, originating from a rat nerve cells tumour and MCF7 from breast cancer, inhibits their proliferation and regroups them to "cellular island".

## CONCLUSIONS

Analysing the obtained results, it can be affirm that the functionalization of PAN membranes with high concentrations of graphene causes an improvement of electrical and thermal properties of the membranes, besides, to improve a high transmembrane porosity and smoother and uniform surface.

According to cell culture results, PAN/G membranes inhibit the differentiation of C6 cell to astrocytes, they are not good scaffolds for the regeneration of neuronal tissue. As a scaffold for MCF7 and NSC34 cells, it avoids their proliferation and regroups them into "cellular island" by a mechanism that involves the formation of adherens bonds typical of epithelial tissues.

It is proposed as future works the study of the formation of this "epitelial cellular island" in other cancer cell lines and investigate the molecular mechanism that underlies that alteration from cell fate.

## REFERENCES

- [1] NIH (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering). Tissue Engineering and Regenerative Medicine. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>
- [2] Salehi-Nik, N et al. 2013. Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. BioMed Research Internationa (ID 762132). Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/762132>
- [3] REYERO, J. 2017. *Membranas de Poliacrilonitrilo funcionalizadas con Óxido de Grafeno para su aplicación en la regeneración de tejido neuronal*. Diban, N.; Sánchez, S. (dirs.). Trabajo Fin de Grado. Disponible en UCrea: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/12132>

*En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a Nacely Diban-Ibrahim Gómez, directora de este proyecto, por toda su dedicación, ayuda y paciencia durante este tiempo.*

*Agradecer también a los miembros del Departamento de Anatomía y Biología Celular, en especial a María Teresa Berciano, por su tiempo. Gracias a Olga Tapia, codirectora de este proyecto, por toda su ayuda y formación recibida en este nuevo campo de estudio para mí, la biología celular.*

*A mi familia y pareja, gracias por su apoyo y ánimo durante estos años.*

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1. Objetivo .....	6
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
<b>2.1. Fabricación de las Membranas PAN/G</b> .....	7
2.1.1. Preparación de la Disolución Polimérica.....	7
2.1.2. Técnica de Inversión de Fases .....	8
<b>2.2. Caracterización Morfológica y Físicoquímica de las Membranas</b> .....	9
2.2.1. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido SEM.....	9
2.2.2. Ángulo de Contacto con Agua .....	10
2.2.3. Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier FTIR .....	10
<b>2.2 Caracterización de Flujo de Agua</b> .....	11
<b>2.3. Análisis de la Conductividad y Permitividad Dieléctrica mediante Impedancia</b> .....	12
<b>2.4. Análisis Termogravimétrico TGA</b> .....	13
<b>2.5. Cultivos Biológicos sobre las membranas PAN/G</b> .....	13
2.5.1. Preparación y Esterilización de Membranas PAN/G para Cultivos Biológicos .....	14
2.5.2. Siembra de las Líneas Celulares sobre las Membranas PAN/G .....	14
2.5.3. Ensayo de Adhesión Celular .....	15
2.5.4. Ensayo de Diferenciación Celular .....	15
2.5.5. Análisis Morfológico .....	16
2.5.6. Evaluación de la Citotoxicidad Celular .....	16
2.5.7. Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal Láser .....	16
<b>3. RESULTADOS Y DISCURSIÓN</b> .....	17
<b>3.1. Caracterización Morfológica y Físicoquímica de las Membranas PAN/G</b> .....	17
<b>3.2. Análisis de la Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier FTIR</b> .....	20
<b>3.3. Caracterización de Flujo de Agua</b> .....	21
<b>3.4. Análisis de Impedancia</b> .....	22
<b>3.5. Análisis de la Biocompatibilidad de las membranas PAN/G</b> .....	26
3.5.1. Ensayo de Adhesión Célula-Matriz .....	26
3.5.2. Ensayo de Diferenciación Celular .....	27
3.5.3. Ensayo de Citotoxicidad .....	29
3.5.4. Análisis Morfológico .....	30
3.5.5. Ensayo de Adhesión Célula-Célula.....	31
<b>4. CONCLUSIONES Y FUTUROS TRABAJOS</b> .....	33
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	35

## Lista de Figuras y Tablas

<b>Figura 1:</b> Equipo de ultrasonidos.....	8
<b>Figura 2:</b> Técnica de inversión de fases y proceso de casting para membranas PAN/G...	9
<b>Figura 3:</b> Comportamiento de la superficie frente al agua en función del ángulo de contacto [29]. .....	10
<b>Figura 4:</b> Sistema experimental utilizado en la caracterización del flujo de agua formado por un tanque de alimentación (1), bomba peristáltica (2), celda soporte (3) y una válvula y manómetro (4). .....	12
<b>Figura 5:</b> Cámara de Neubauer utilizada para el recuento celular. ....	14
<b>Figura 6:</b> Imágenes SEM de la superficie de las membranas PAN/G a magnificaciones x1000 y x5000. ....	17
<b>Figura 7:</b> Imágenes SEM de la sección transversal de las membranas PAN/G a magnificaciones x250 y x500. ....	18
<b>Figura 8:</b> Espectro característico de emisión infrarroja de las muestras analizadas. ....	20
<b>Figura 9:</b> Media y desviación de permeabilidad hidráulica en membranas PAN/G.....	21
<b>Figura 10:</b> Conductividad eléctrica frente a la frecuencia de cambio de potencial eléctrico.....	22
<b>Figura 11:</b> Conductividad de las membranas PAN/G del análisis de impedancias a diferentes frecuencias de cambio de potencial. ....	23
<b>Figura 12:</b> Permitividad dieléctrica relativa entre la permitividad del vacío frente a la frecuencia de cambio de potencial eléctrico. ....	24
<b>Figura 13:</b> Análisis termogravimétrico de las membranas PAN/G.....	25
<b>Figura 14:</b> Imágenes microscópicas panorámicas (objetivo 20X) y en detalle (objetivo 63X), de células C6 marcadas con Falloidina-FITC durante proceso de diferenciación a atrociitos, sobre cristal (A-D) o membranas PAN/G10 (F-I). Análisis cuantitativo del porcentaje de células diferenciadas presentes en cristal (E) y en membranas PAN/G10 (J) durante el ensayo de diferenciación. Barra de medida: 50µm (A-B, F-I) y 10µm (C-D, H-I).....	28
<b>Figura 15:</b> Imágenes microscópicas panorámicas (objetivo 20X) y en detalle (objetivo 63X), de células NSC34 marcadas con Falloidina-FITC durante proceso de diferenciación a motoneuronas sobre cristal (A-D) o membranas PAN/G10 (F-I). (Análisis cuantitativo del porcentaje de células diferenciadas presentes en cristal (E) y en membranas PAN/G10 (J) durante el ensayo de diferenciación. Bara de medida: 50µm (A-B, F-I) y 10µm (C-D, H-I). ....	29
<b>Figura 16:</b> Ejemplo de un núcleo apoptótico(A). Ensayo de citotoxicidad en las células NSC34 (B). Barra de medida 50 µm .....	30
<b>Figura 17:</b> Imágenes de células MCF7 marcadas con Falloidina-FITC durante su crecimiento en cristal (A) y membranas PAN/G10 (B-C). Barra de medida 20µm.....	30
<b>Figura 18:</b> Análisis morfológico para determinar el cambio en área y circularidad de las células MCF7 y NSC34 en PAN/G10. ....	31

**Figura 19:** Imágenes del ensayo de adhesión célula-célula en las MCF7 (A-B). Barra de medida 10µm. Análisis de perfiles de los canales de fluorescencia E-cadherina y F-actina (C, d, e). ..... 32

**Tabla 1:** Codificación y composición de las diferentes membranas fabricadas. .... 7

**Tabla 2:** Resultados de espesor, porosidad, tamaño de poro y ángulo de contacto de las membranas PAN/G. .... 19

**Tabla 3:** Temperaturas características del TGA para las membranas PAN/G..... 25

## 1. INTRODUCCIÓN

El poliacrilonitrilo (PAN) es un polímero de gran importancia comercial, ya que actualmente es el precursor de aproximadamente el 90% de las fibras de carbono fabricadas [1]. Tradicionalmente el PAN se ha sintetizado para su uso en procesos de separación, como membranas de ultrafiltración o fibras huecas para ósmosis inversa, y para fibras textiles. [2]. Debido a las excelentes propiedades que presentaban las diferentes estructuras de PAN, como su estabilidad térmica, resistencia a la mayoría de los solventes y una alta resistencia mecánica [3], [4], comenzó a utilizarse como soporte en aplicaciones relacionadas con la ingeniería tisular (IT).

La IT es la rama de bioingeniería que estudia la incorporación de biomateriales y células para regenerar los tejidos y órganos total o parcialmente dañados [5]. La opción más eficiente de solucionar estas patologías es mediante el trasplante, pero es una opción limitada debido al alto riesgo de incompatibilidad y la escasez de donantes. La IT se basa en la extracción de células autógenas del paciente, o donante, y su cultivo en un biorreactor sobre una estructura de soporte o *scaffold* donde se depositarán las células, para su posterior implantación en el paciente complementando las funciones del órgano o tejido dañado [6]. Se denomina biorreactor a un sistema en el que se suministran los nutrientes necesarios y en el que las condiciones están controladas para crear un microentorno adecuado favoreciendo así el crecimiento celular y la formación de tejidos, de forma segura y reproducible [7]. La función de los soportes es favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Deben ser estructuras biocompatibles y biodegradables, cuya superficie y propiedades de transporte simulen el tejido en el que vaya a ser insertado con el fin de mejorar la eficacia y funcionalidad de la construcción de este [8].

Tanto su versatilidad como la facilidad de procesamiento han provocado el aumento de las aplicaciones de los polímeros sintéticos como soportes en la ingeniería de tejidos. Estudios recientes han mostrado que la técnica de inversión de fases es un método rápido y económico que ha dado lugar a membranas reproducibles de diferentes materiales poliméricos [9], [10]. Esta técnica consiste en la conversión del polímero en fase líquida al estado sólido [11]. La disolución polimérica precipita en un baño de coagulación en el que el polímero no es soluble. Esta precipitación se produce debido al intercambio del disolvente orgánico de la disolución polimérica con el no disolvente en el baño de coagulación [12].

Existen en la literatura trabajos recientes donde utilizan membranas de PAN como soportes para ingeniería de tejidos. Morelli, S. et al estudian, en varios trabajos [13] y [14], las diferencias entre las membranas de PAN y membranas modificadas de polieterecetona (PEEK-WC), ambas en configuración de fibra hueca, usadas como soporte para un sistema de cultivo neuronal del hipocampo para promover la formación de una red neuronal de alta densidad. Como resultado se reportó que la alta

permeabilidad hidráulica de las membranas de fibra hueca de PAN favorece el crecimiento axonal y diferenciación neuronal induciendo la reconstrucción in vitro de redes neuronales.

Debido a la alta permeabilidad hidráulica que poseen las membranas de PAN [13],[14], proporciona una mejora en la transferencia de masa de nutrientes y metabolitos a las células y la eliminación de catabolitos, esenciales para mantener la supervivencia celular [9] [15], se puede afirmar que estas membranas sintéticas son un apto candidato para ser usadas como soporte en el cultivo in vitro de tejidos en biorreactores para su utilización en el ámbito de ensayo clínico.

A menudo, los soportes de polímeros sintéticos se han combinado con nanomateriales basados en grafeno con el fin de mejorar sus propiedades y mejorar la respuesta celular, como menciona Wang et al [3] agregando nanotubos de carbono a las nanofibras de PAN compuestas. Para sintetizar los soportes de polímero y nanomateriales de grafeno destinados a aplicaciones en IT se han utilizado diferentes métodos para incluir estos nanomateriales en la matriz del polímero. En la mayoría de los estudios se dispersaron los nanomateriales en un disolvente orgánico y luego agregaron el polímero, que se disolvió en la dispersión antes de eliminar el disolvente para inducir la coagulación del polímero [16],[17]. La dispersión se logró mediante ultrasonidos, el tiempo y la potencia de sonicación necesarios para lograr una disolución homogénea y dispersa depende de la concentración y los materiales utilizados. [11]

En el campo de la ingeniería de tejidos neuronal, los nanomateriales basados en grafeno han ganado un interés significativo, ya que pueden recrear entornos adecuados para el crecimiento de las células neuronales [11]. Especialmente, las propiedades conductoras del grafeno pueden ser útiles en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas [18]. Se ha observado en anteriores trabajos que las propiedades eléctricas de estos nanomateriales favorecen la diferenciación neuronal además de aportar al soporte una mayor resistencia mecánica [19]. Durante el proceso de regeneración, las neuritas deben interconectarse y recuperar la continuidad eléctrica [20]. Lorenzoni et al. [21] han confirmado que el sustrato de grafeno promueve el crecimiento de neuritas para formar una red neuronal interconectada organizada en el grafeno.

Los nanomateriales de la familia del grafeno se diferencian en términos de química, superficie, pureza y composición, en grafeno de una sola capa, grafeno multicapa, óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO). El grafeno es una lámina de un átomo de carbono de espesor. Está compuesto exclusivamente por átomos de carbono con enlaces  $sp^2$  hibridados, que están dispuestos en forma de panal 2D estrechamente empaquetados. Cada átomo de carbono tiene tres enlaces  $\sigma$  y un enlace  $\pi$  fuera del plano que puede unirse con los átomos vecinos [20]. Estos orbitales  $\pi$  se superponen, generando enlaces  $\pi$  entre cada par de átomos de carbono adyacentes [11]. Esta estructura atómica junto a la distribución de electrones del grafeno supone

comportamientos ópticos únicos, excelentes propiedades mecánicas, gran área de superficie y extraordinaria conductividad térmica y eléctrica [20].

Los tejidos neuronales, cardíacos y musculares necesitan soportes basados en conductores para lograr su regeneración óptima. Mahmoudifard et al [22] demostraron que las membranas de PAN y polianilina con nanohojas de G y GO con el ácido orgánico canforsulfónico (PAN/PANI-CSA/G y GO) son sustratos biocompatibles para la ingeniería del tejido muscular eléctrico. Hitscherich et al [19] reportaron el potencial de la adición de grafeno a la estructura compuestas de policaprolactona (PCL/G) para la ingeniería de tejidos cardíacos. Diban et al [23] y Sánchez et al [24] concluyen en sus trabajos que en las membranas composite de PCL con nanopartículas de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido la respuesta de células neuronales era mucho más acusada frente a las membranas de PCL sin nanomateriales.

El porcentaje de grafeno en los soportes para IT es un parámetro crítico a tener en cuenta ya que un alto porcentaje podría disminuir las propiedades mecánicas de los soportes [22]. Se reporta de la literatura que la adición de una cantidad minúscula de nanopartículas de grafeno [21], [23] mejora la conductividad sin comprometer el resto de las propiedades del soporte.

La biocompatibilidad y la citotoxicidad de los nanomateriales basados en grafeno dependen de sus propiedades físicoquímicas intrínsecas, siendo la concentración y el tiempo de exposición los principales parámetros que pueden causar toxicidad. Sin embargo, las incorporaciones de bajas concentraciones de estos nanomateriales en biomateriales han proporcionado resultados exitosos sobre la diferenciación neuronal [11] y sobre el tejido cardíaco. [19].

### 1.1. Objetivo

Tanto la parte experimental como la supervisión del presente trabajo ha sido desarrollado entre el grupo de investigación de Tecnologías Ambientales y Bioprocesos (TAB) del Departamento de Ingeniería Química y Biomolecular y el grupo de Biología Celular del Núcleo del Departamento de Anatomía y Biología Celular, ambos de la Universidad de Cantabria.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la concentración máxima de grafeno que es posible introducir en una matriz de membrana de PAN sintetizada mediante un proceso de inversión de fases produciendo una estructura porosa y qué efecto produce el diferente grado de concentración del nanomaterial sobre diferentes propiedades morfológicas, físico-químicas, de transporte, térmicas y de conductividad eléctrica. Además, se llevará a cabo un barrido de la influencia de estos nuevos materiales sobre diferentes líneas celulares y así evaluar su potencial aplicación biomédica

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Fabricación de las Membranas PAN/G

#### 2.1.1. Preparación de la Disolución Polimérica

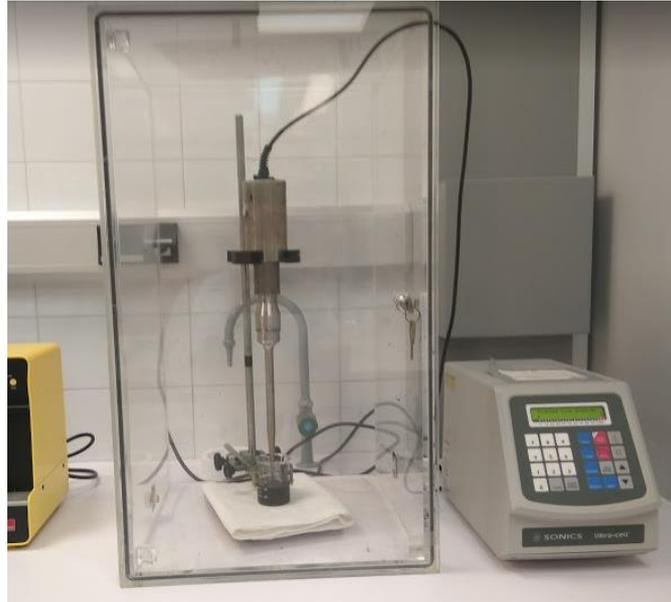
Para estudiar la influencia de la concentración de grafeno (G) (av-PLAT-7, Avanzare Innovation Tecnología, España) en las membranas de poliacrilonitrilo (PAN) (M.W. 150 kDa, J&K Scientific GmbH, Alemania) se van a sintetizar membranas PAN funcionalizadas con diferentes concentraciones de grafeno, dichas concentraciones se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1: Codificación y composición de las diferentes membranas fabricadas.

Codificación	PAN (% wt)	G (% wt)	Baño de Coagulación W/NMP (% v/v)
PAN/G0	10	0	80/20
PAN/G2		2	
PAN/G10		10	
PAN/G15		15	

Se detalla el procedimiento experimental seguido para la preparación de la disolución polimérica de PAN empleando como disolvente orgánico N-metil-2-pirrolidona (NMP) (99% de pureza, Acros Organics, Holanda):

- Se dispersan en un vaso de precipitados las cantidades correspondientes de G y NMP. Para ello se utiliza un equipo de ultrasonido (VCX500, Sonics Vibra-cell) durante 20 minutos, a 30% de amplitud y con un pulso de 19.01 segundos, con la punta del ultrasonido sumergida 1 cm en centro del vaso como se puede apreciar en la Figura 1.
- Se añade a la disolución dispersada la cantidad correspondiente de PAN.
- Dejar la disolución en agitación durante 24 horas con un agitador mecánico de rotación vertical. Pasado este tiempo se para la agitación y se puede observar como la disolución ha adquirido esa consistencia pegajosa característica de las disoluciones poliméricas. Se dejan las aspás del agitador levantadas para dejar caer por gravedad los restos de la disolución y desgasificar así otras 24 horas.



**Figura 1:** Equipo de ultrasonidos.

Para la síntesis de las membranas PAN/GO se procede de forma similar a como se ha explicado anteriormente omitiendo el paso donde se dispersa el G.

Para la manipulación de los materiales se toman las precauciones de seguridad necesarias.

### 2.1.2. Técnica de Inversión de Fases

Las membranas PAN/G se fabrican mediante la técnica de inversión de fases y el proceso de casting, ilustrado en la Figura 2. Se vierte la disolución polimérica en la placa de cristal, se ajusta el tamaño de luz del cuchillo de casting a  $200\ \mu\text{m}$  y se desliza sobre la disolución extendiéndola sobre la placa. Se sumerge el cristal en un recipiente con el baño de coagulación (Tabla 1), donde la membrana precipita y se separa espontáneamente del cristal. Las membranas se dejan 24 horas en un segundo baño de coagulación con la misma composición. Posteriormente se procede al lavado de las membranas con agua 3 veces al día para eliminar los restos del baño de coagulación.

Las membranas PAN/G se mantienen en húmedo hasta su caracterización. Para las caracterizaciones que requieran membranas en seco se utilizará el glicerol (pureza 99,87%, Calbiochem) como preservante. Se sumergen las membranas en una disolución agua/glicerol al 75% v/v y después de 24 horas se dejan secar al aire.



**Figura 2:**Técnica de inversión de fases y proceso de casting para membranas PAN/G.

## 2.2. Caracterización Morfológica y Fisicoquímica de las Membranas

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

Con las imágenes tomadas por un microscopio electrónico de barrido SEM (EVO MA 15 MA 15, Carl Zeiss, Alemania) a una potencia de 20 kV se ha podido analizar la estructura y morfología tanto de la superficie como la sección transversal de las membranas PAN/G. Fue necesario preparar las membranas antes de realizar esta caracterización, las muestras destinadas a tomar imágenes de la sección transversal se congelaron en nitrógeno líquido y se fracturaron posteriormente. Todas las muestras se mantuvieron al vacío a 30°C y se realizó sobre ellas un recubrimiento de oro [23], que es un recubrimiento para que la muestra sea conductora [25].

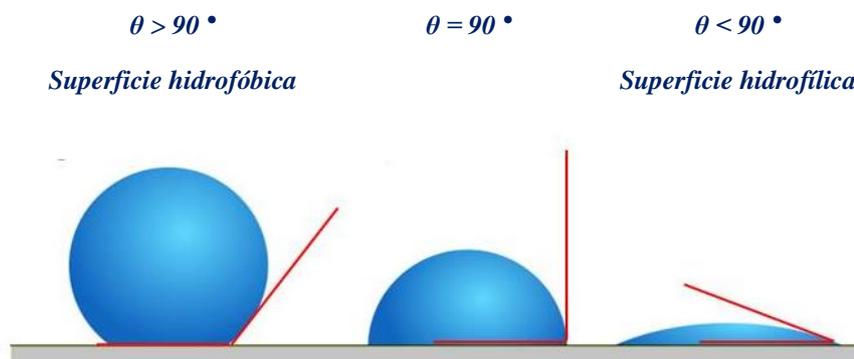
Las imágenes SEM obtenidas se analizaron con el software Fiji (ImageJ, NIH (National Institutes of Health)), siguiendo el procedimiento explicado por Buckman et all. [26] para determinar el tamaño de poro y cuantificar la porosidad tanto en la superficie como en la sección transversal de las membranas PAN/G mediante la fracción de área porosa. Se define la fracción de área porosa como el área de los poros entre el área total de la membrana [27].

Además, el espesor de las membranas PAN/G se midió con un micrómetro electrónico (Standar, Series 293, Mitutoyo, España) [23].

### 2.2.2. Ángulo de Contacto con Agua

Los materiales hidrófilos son aquellos en los que el agua se extiende sobre su superficie, tienen afinidad por el agua. Los materiales que repelen el agua y esta forma gotas sobre su superficie son hidrofóbicos [28]. Los materiales hidrófilos e hidrofobos se pueden diferenciar por el ángulo de contacto que se define como el ángulo que se forma entre su superficie y la tangente de la gota de agua sobre ella (Figura 3).

Se han analizado los datos del ángulo de contacto fotografiando el momento exacto en el que una gota de agua ultrapura se deposita en la superficie de la membrana. Estas fotos se procesaron con el programa Measure (C Thing Software).



**Figura 3:** Comportamiento de la superficie frente al agua en función del ángulo de contacto [29].

### 2.2.3. Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier FTIR

Para poder conocer la estructura molecular de las membranas de PAN/G se realizó el análisis de espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier FTIR. Cuando la radiación de infrarrojos alcanza la muestra, parte de esa radiación es absorbida por la muestra y otra parte la atraviesa, se transmite [30]. La transformada de Fourier convierte la señal de salida del detector en un espectro interpretable de la reflexión de las bandas de los grupos funcionales presentes en el material [31]. Se puede determinar la estructura de la muestra ya que cada grupo funcional posee su propia banda característica, siempre en los mismos intervalos de longitud de onda, independientemente de la naturaleza del resto del compuesto [32].

Tanto las muestras sólidas de las membranas PAN/G como G polvo y PAN polvo se caracterizaron utilizando un espectrómetro Spectrum 65 (Perkin Elmer) con un accesorio de reflectancia total atenuada ATR (GladiATR, PIKE Technologies) [11].

## 2.2 Caracterización de Flujo de Agua

Para conocer las propiedades de permeabilidad hidráulica que poseen las membranas se ha analizado el flujo de agua que es capaz de permear a través de las membranas. Para realizar esta caracterización se utilizó el sistema experimental de flujo tangencial mostrado en la Figura 4, que está formado por de un tanque de alimentación de 2L de agua, calentado por un sistema eléctrico (313D, Watson-Marlow); una bomba peristáltica (Schlee GmbH & Co); una celda soporte que es donde se aloja la membrana; un manómetro y una válvula manual con la que se puede regular la presión transmembranal del sistema. El permeado obtenido es recogido en un recipiente que está conectado a una balanza que automáticamente monitoriza y recoge la masa en intervalos de 1 minuto mediante el uso del software Pomiar Win (V5.2.0). El retenido se recircula al tanque de alimentación.

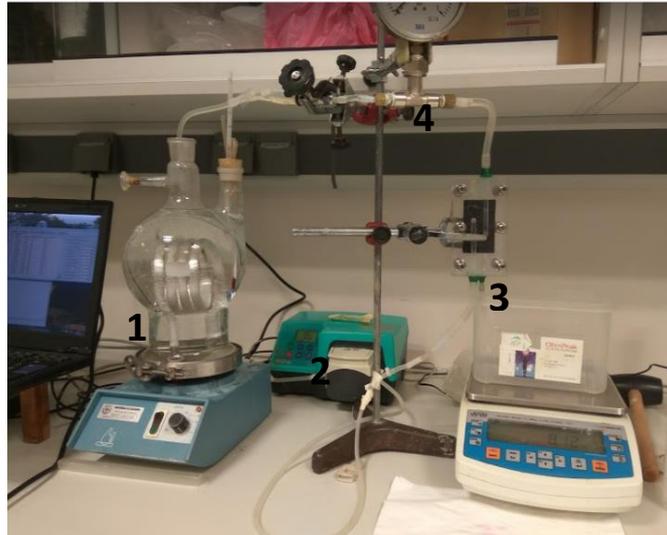
El experimento se realiza a una temperatura constante del líquido contenido en el tanque de alimentación de 37 °C. Se fija la presión máxima de trabajo hasta alcanzar el estado estacionario, durante al menos 30 minutos. Pasado este tiempo, se cambia la presión transmembranal en un rango entre 0,04-0,14 bar en ciclos descendentes y ascendentes y se vuelven a tomar datos en estado estacionario en cada punto de presión establecido.

El software del sistema experimental mencionado anteriormente representa los datos del permeado acumulado en función del tiempo. De esta gráfica se obtiene la pendiente para cada intervalo de presiones ( $W$  permeado/ $\Delta t$ ).

El flujo de agua  $J_w$  ( $L/h \cdot m^2$ ) para cada presión se calculó utilizando la ecuación 1, donde el área efectiva de la membrana es  $A_e=10 \text{ cm}^2$  y  $\Delta t$  es el período de tiempo de la recolección del permeado [33]. Representando el flujo permeado de agua obtenido a cada valor de presión frente al incremento de presiones ( $\Delta P$ ) se obtiene una regresión lineal cuya pendiente es la permeabilidad hidráulica  $P_w$  ( $L/h \cdot m^2 \cdot \text{bar}$ ) de la membrana de acuerdo a la ecuación 2.

$$J_w = \frac{W_{\text{permeado}}}{\Delta t \cdot A_e} \quad \text{Ec. 1}$$

$$P_w = \frac{J_w}{\Delta P} \quad \text{Ec. 2}$$



**Figura 4:** Sistema experimental utilizado en la caracterización del flujo de agua formado por un tanque de alimentación (1), bomba peristáltica (2), celda soporte (3) y una válvula y manómetro (4).

### 2.3. Análisis de la Conductividad y Permitividad Dieléctrica mediante Impedancia

Se define la conductividad eléctrica como la capacidad de transportar corriente eléctrica que tiene un material. La conductividad está representada por la letra griega  $\sigma$ , se define como la inversa de la resistividad eléctrica y tiene unidades  $1/\Omega\cdot m$  que es equivalente a Siemens (I/V) por metro, S/m.

La resistividad eléctrica es la capacidad que posee un material de soportar la corriente eléctrica. La resistividad está representada por la letra  $\rho$ . Si en un material la electricidad puede fluir fácilmente a través de él, tiene una baja resistividad, es un material conductor. Si el material opone resistencia al paso electricidad su resistividad es elevada y se define como un material aislante [34].

Se analizaron las propiedades eléctricas a lo largo del espesor de las membranas PAN/G mediante la caracterización de la impedancia eléctrica. Las mediciones de impedancia se llevaron a cabo en el Departamento de Química Física de la Universidad de Valencia (supervisados por los Prof. Dr. Pedrós, Dr. Jareño y Dr. Agrisuelas).

El experimento se realizó en un medidor RCL automático programable PM 6304 (Philips) donde se utilizó la membrana como electrolito colocada entre dos láminas de níquel, que actuaron de electrodos [11]. Las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y variando la frecuencia de cambio del potencial eléctrico ( $f$ ) entre 50 y 100000 Hz.

El análisis de impedancia proporcionó una respuesta sinusoidal obteniendo los valores de módulo de impedancia ( $Z$ ) y ángulo de fase ( $\varphi$ ). Para calcular la resistividad ( $\rho$ ) y permitividad dieléctrica relativa ( $\epsilon_r$ ) de las membranas se utilizaron las ecuaciones 3 y

4, donde S es el área de contacto y L el espesor de las membranas. La conductividad se calcula mediante el inverso de la resistividad.

$$\rho (\Omega \cdot \text{cm}) = \frac{R \cdot S}{L} \quad \text{Ec. 3}$$

$$\epsilon_r = \frac{C \cdot L}{S} \quad \text{Ec. 4}$$

La resistencia R y la capacitancia C se calculan a partir del módulo de impedancia real Z' ( $\Omega$ ) e imaginario Z'' ( $\Omega$ ), utilizando las ecuaciones 5 y 6, donde  $\omega$  es la frecuencia angular calculada como  $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$ .

$$R = Z' \cdot \text{Cos}(\phi) \quad \text{Ec. 5}$$

$$C = Z'' \cdot \text{Sen}(\phi) \cdot \omega \quad \text{Ec. 6}$$

## 2.4. Análisis Termogravimétrico TGA

El análisis termogravimétrico TGA estudia la variación de masa de una muestra a medida que aumenta su temperatura [35]. El TGA se realizó en una termobalanza DTG-60H (Shimadzu) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se analizaron muestras de 5-10 mg, sujetas a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, desde la temperatura ambiente hasta 800 °C. Las pérdidas de masa están asociadas a procesos de descomposición de materiales, evaporación de sustancias y reducción de compuestos, y las ganancias de masa a oxidaciones o adsorciones de compuestos [36].

De los perfiles TGA graficados se obtienen dos valores de temperaturas características: la  $T_{\text{onset}}$  que se define como la temperatura en la cual el material comienza a degradarse y la  $T_{\text{max}}$  que es la temperatura que proporciona la tasa de degradación más rápida [11].

## 2.5. Cultivos Biológicos sobre las membranas PAN/G

Para el estudio *in vitro* de la biocompatibilidad de las membranas PAN funcionalizadas con diferentes concentraciones de grafeno, se han utilizado las líneas celulares C6, un clon celular aislado a partir de un tumor glial de rata y que tienen la capacidad de diferenciarse a astrocitos-like cuando son subcultivadas en presencia de 1mM dibutilil AMP cíclico (dbcAMP) [37]; NSC34, una línea celular murina híbrida compuesta por células de neuroblastoma y motoneuronas embrionarias capaces de diferenciarse a motoneuronas-like [38]; MCF7, una línea celular procedente de un adenocarcinoma de glándulas mamarias humanas [39]; HeLa, línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano [40].

En todos los casos las líneas celulares se cultivaron en una placa petri en medio DMEM con alto contenido de glucosa y sin piruvato de sodio (Gibco), enriquecido con 10% de

suero fetal bovino (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco) y 1% penicilina/estreptomicina mg/mL (Gibco) y se mantuvieron en un incubador a temperatura constante de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 95%. En condiciones normales, se realizó el pase de células, bajo una campana de flujo laminar vertical de bioseguridad tipo II, cuando éstas se encontraban al 80% de confluencia y el medio se cambió cada 2-3 días.

### 2.5.1. Preparación y Esterilización de Membranas PAN/G para Cultivos Biológicos

Fue necesario la preparación de las membranas PAN/G antes de realizar los estudios de biocompatibilidad, se obtuvieron muestras circulares de 12 mm de diámetro con un saca bocados del centro de las membranas. Utilizando silicona quirúrgica se pegaron a un cubreobjetos de cristal para evitar su flotación. Antes de proceder a la siembra de las líneas celulares las membranas se esterilizaron con 3 lavados de etanol 96% y se dejaron secar al aire bajo luz ultravioleta (UV). Por último, se lavaron 3 veces con PBS (132 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) estéril antes de su uso.

### 2.5.2. Siembra de las Líneas Celulares sobre las Membranas PAN/G

Para llevar a cabo la siembra celular sobre las membranas PAN/G se utiliza la enzima proteolítica tripsina que descompone las proteínas de adhesión que mantienen a las células adheridas al fondo de la placa. La actividad óptima de la tripsina se alcanza a 37 °C, por lo que se deja actuar sobre el cultivo celular, en el incubador durante 5 min [41]. Una vez neutralizada la tripsina con medio de cultivo, se resuspenden las células y se centrifugan a 1000 rpm. Tras la aspiración del sobrenadante, las células se disgregan y se resuspenden en 3ml de medio y se calcula la densidad celular (nº células/mL) utilizando una cámara de Neubauer (BRAND) (Figura 5). El volumen definido de suspensión celular se siembra en cada pocillo de una placa multiwell y se completa con medio de cultivo hasta 1 ml.



**Figura 5:** Cámara de Neubauer utilizada para el recuento celular.

### 2.5.3. Ensayo de Adhesión Celular

Para el estudio de la influencia sobre la capacidad de adhesión celular se siembran las células sobre la superficie de las diferentes membranas de grafeno (PAN/G0, PAN/G2 y PAN/G10) a una densidad de 40.000 células/cm<sup>2</sup> (C6, MCF7, HeLa) o 50.000 células/cm<sup>2</sup> (NSC34). Como control positivo se realiza una siembra sobre un cubreobjetos de cristal que permitió la monitorización del cultivo con un microscopio óptico de luz invertida. Los cultivos se mantienen durante 24 horas en un incubador a 37 °C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa de 95%. Para la observación de las células adheridas a las membranas opacas PAN/G2 y PAN/G10 fue necesario el uso de un microscopio óptico de epifluorescencia (Axioskop 2 plus, Zeiss). Para ello, previamente, las células se "fijaron" con una solución de para-formaldehído (PFA) al 3,7% en PBS durante 15 minutos con agitación constante. Tanto el cristal control como las membranas PAN/G se incubaron con una solución conteniendo 1µg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), molécula fluorescente que se intercala entre las hebras del DNA y revela los núcleos celulares [42]. Utilizando una cámara AxioCam HRc (Zeiss) se realizaron 3 imágenes aleatorias y se contó del número total de núcleos por unidad de superficie.

### 2.5.4. Ensayo de Diferenciación Celular

Para analizar la influencia de la composición de las membranas PAN/G sobre la capacidad de diferenciación de las células C6 y NSC34 a astrocitos y motoneuronas-like, respectivamente, se siembran dos muestras sobre cada membrana y sobre el control positivo (cristal). Tras 24 horas (d0) se cambia el medio de cultivo a medio de diferenciación y se incuban 48 h adicionales (d2). En el caso de las C6, el medio de diferenciación consiste en DMEM suplementado con 0,25% FBS, 1% NEAA, 1% pen/strep y 1mM de dbcAMP; mientras que el de las NSC34 es Neuronal basal medium (Gibco) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina.

La capacidad de diferenciación se valoró comparando la morfología de células a d0 y d2, cultivadas sobre las membranas PAN/G0, PAN/G2 y PAN/G10. Se utilizó el microscopio de epifluorescencia para visualizar la morfología celular y poder cuantificar el porcentaje de células que presentan formación de "procesos" astrocíticos (C6) o "dendritas" neuronales (NSC34). Para ello las células se fijan en PFA al 3,7% durante 15 minutos y se permeabiliza la membrana celular con 0.5% Triton-X100 durante 15 minutos. Las muestras se lavan con PBS y se incuban durante 30 minutos con Falloidina conjugada al fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína). La faloidina es una micotoxina producida por el hongo *Amanita phalloides* que se une directamente a los filamentos de actina y se utiliza como marcador de la corteza celular.

### 2.5.5. Análisis Morfológico

Las imágenes obtenidas para el estudio de diferenciación celular se utilizaron para el análisis morfológico de la línea celular NSC34. Además, este estudio también se realizó para comparar células MCF7, 24 horas después de su siembra sobre cristal y membranas PAN/G10. Utilizando el software ImageJ (NIH) se obtuvo el valor del área celular y el factor de forma o circularidad, que se define como el cuadrado de la relación del perímetro de un círculo que tiene el mismo área proyectada (A) que la partícula dividido entre el perímetro de la partícula (P) ( $C=4 \cdot \pi \cdot A/P^2$ ) [43]. Este factor varía entre 0 y 1 según la forma celular sea redondeada (valor cercano a 1) o fusiforme (valor cercano a 0).

### 2.5.6. Evaluación de la Citotoxicidad Celular

Este experimento se realizó sobre imágenes tomadas de células NSC34 durante el experimento de diferenciación de esta línea celular. Utilizando el marcaje del núcleo celular explicado en el apartado 2.5.3, se obtuvieron imágenes de fluorescencia sobre las que se cuantificó el porcentaje de núcleos apoptóticos frente a los núcleos normales. La apoptosis es un tipo de muerte celular en la que una serie de procesos moleculares en la célula conducen a su muerte programada. Los núcleos de las células en proceso de apoptosis se fragmentan observándose una morfología nuclear característica.

### 2.5.7. Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal Láser

Para el estudio de la localización subcelular de proteínas se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta, donde se utilizan anticuerpos primarios específicos que reconocen regiones concretas (epítipo) de dicha proteína. La incubación con un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo revelará la localización del primario e indirectamente de la proteína. Para llevar a cabo este estudio células MCF7 cultivadas sobre cristal y membrana PAN/G10 se fijaron en PFA al 3,7% durante 15 minutos y se permeabilizaron en 0.1% Triton-X100 durante 5 minutos. Las muestras se lavan con PBS y se incuban durante toda la noche a 4 °C con una solución que contiene el anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-E-Cadherina (1:100) (BD Transduction Laboratories) para señalar las zonas de uniones "adherens" intercelulares. Al día siguiente, las muestras se lavan con PBS e incuban con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con el fluorocromo Cy3 (1:750) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 45 minutos. Tras varios lavados se realiza el marcaje de los filamentos finos de actina con la incubación con Falloidina-FITC durante 30 minutos. Las muestras se montaron con el medio VectaShield (Vector Laboratories, Peterborough), se sellaron con laca de uñas y a continuación se examinaron con un microscopio confocal láser Zeiss LSM 510 provisto de las líneas de láser Argón (488nm) y HeNe (543nm) para excitar FITC y Cy3 respectivamente.

### 3. RESULTADOS Y DISCURSIÓN

#### 3.1. Caracterización Morfológica y Físicoquímica de las Membranas PAN/G

Las Figuras 6 y 7 muestran las imágenes SEM obtenidas de la superficie y sección transversal de las membranas, respectivamente. En la tabla 2 se recogen los valores obtenidos de la caracterización físicoquímica de las membranas PAN/G, como son su espesor, porosidad y tamaño de poro tanto en la superficie como en la sección transversal, además del ángulo de contacto.

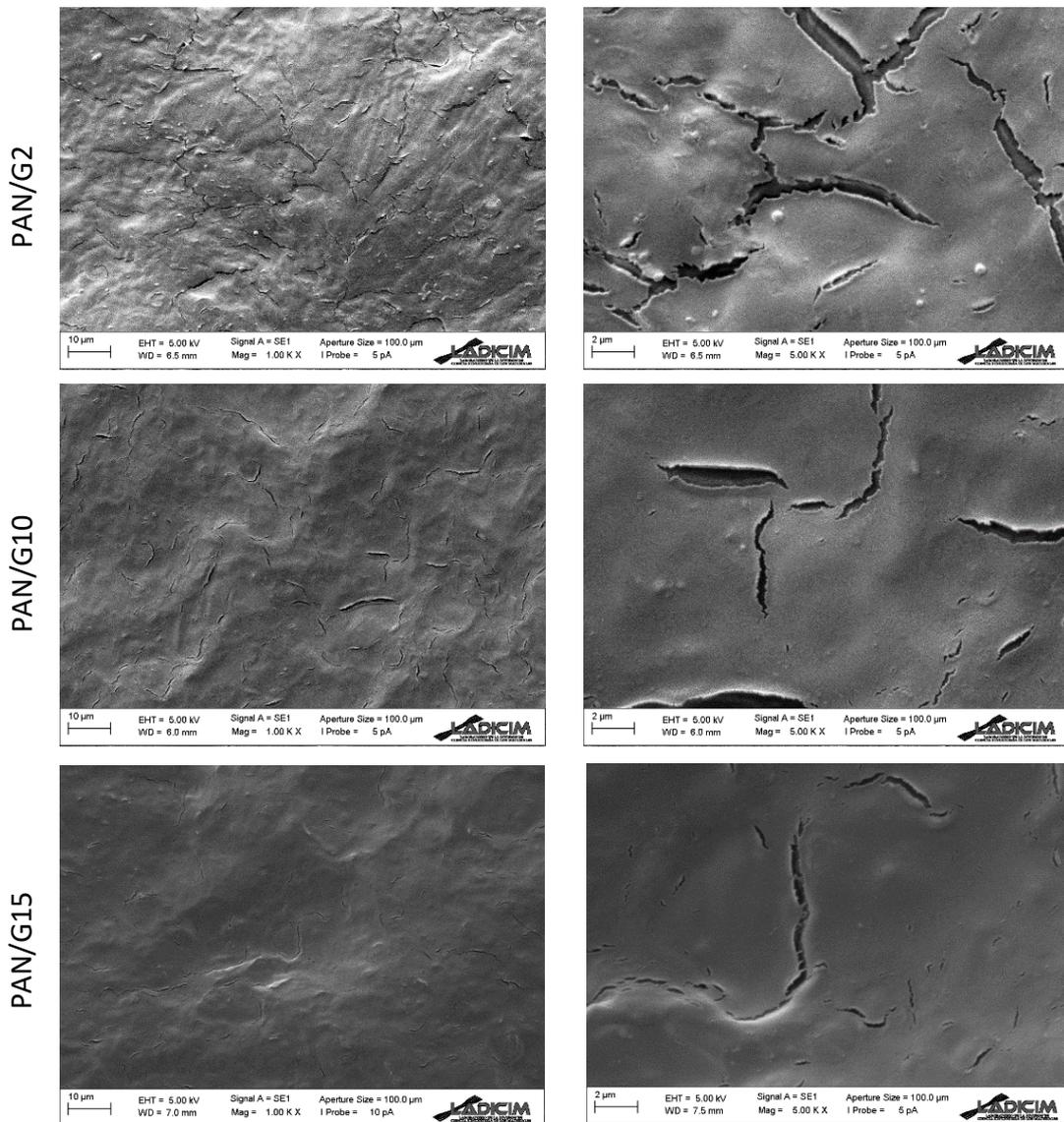


Figura 6: Imágenes SEM de la superficie de las membranas PAN/G a magnificaciones x1000 y x5000.

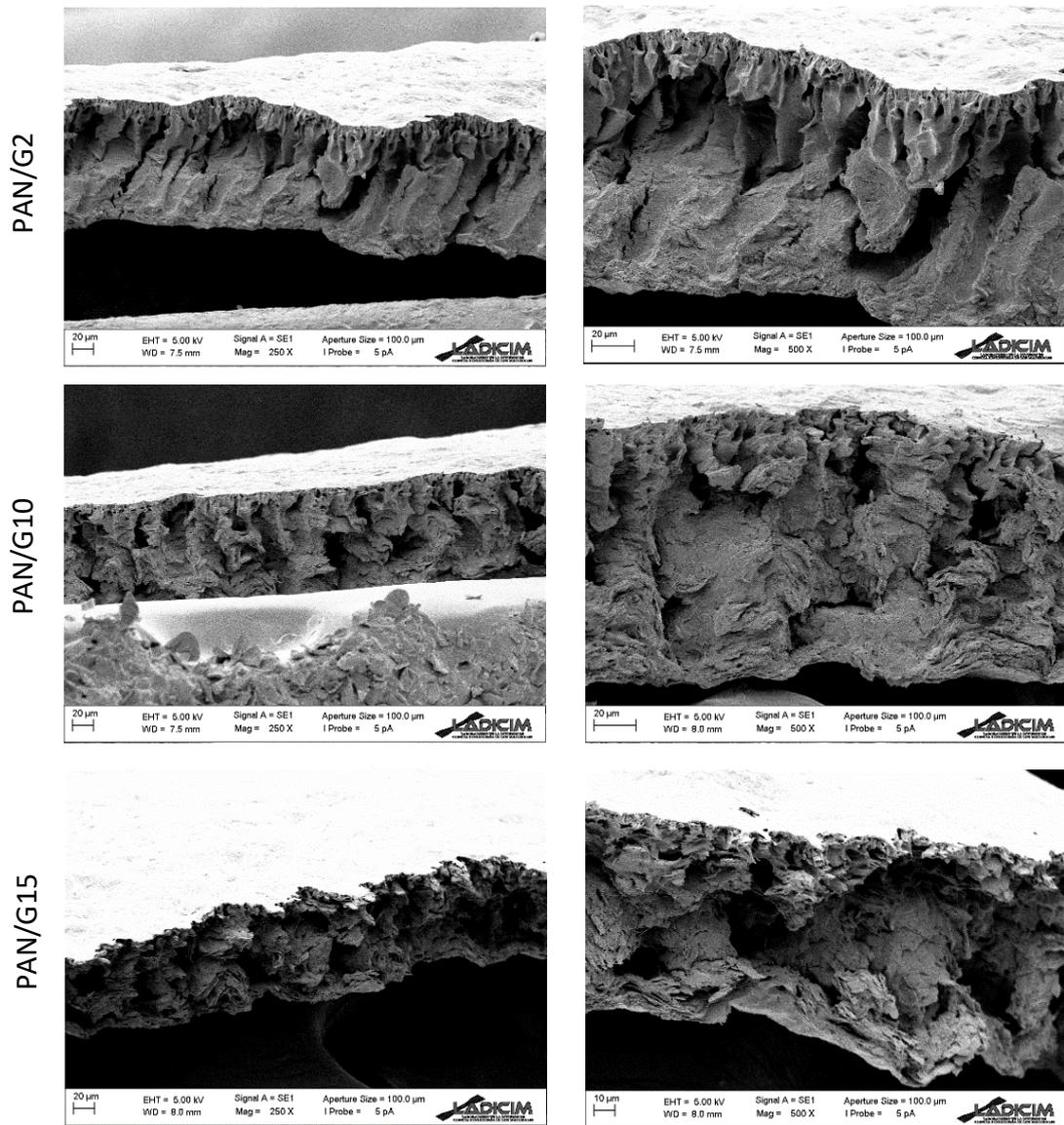


Figura 7: Imágenes SEM de la sección transversal de las membranas PAN/G a magnificaciones x250 y x500.

La superficie de todas las membranas PAN/G (Figura 6) son aparentemente densas, si analizamos la imagen SEM con más aumentos, se pueden apreciar unas pequeñas grietas sobre las superficies.

A medida que aumenta la cantidad de grafeno en la membrana disminuye el número y tamaño de estos *crackings* en la superficie. Esto coincide con los resultados obtenidos en el análisis de la porosidad en la superficie de las membranas de la Tabla 2. El valor de la porosidad de las membranas PAN/G2, aun siendo un porcentaje muy bajo, es el mayor de las tres ( $1,8 \pm 0,9 \%$ ), seguido de las PAN/G10 ( $1,7 \pm 0,6 \%$ ) y las PAN/G15 ( $0,1 \pm 0,11 \%$ ).

**Tabla 2:** Resultados de espesor, porosidad, tamaño de poro y ángulo de contacto de las membranas PAN/G.

Análisis		PAN/G0	PAN/G2	PAN/G10	PAN/G15
Espesor ( $\mu\text{m}$ )		249 $\pm$ 21	187 $\pm$ 9	203 $\pm$ 5	196 $\pm$ 15
Fracción de Área Porosa Superficie (%)		-	1,8% $\pm$ 0,9	1,7% $\pm$ 0,6	0,1% $\pm$ 0,1
Ancho Grietas Superficie ( $\mu\text{m}$ )		-	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,1
Fracción de Área Porosa Sección Transversal (%)		-	24,9% $\pm$ 9,5	17,7% $\pm$ 2,5	47,9 $\pm$ 9,6
Tamaño de Poro Sección Transversal ( $\mu\text{m}$ )	Capa Selectiva	-	2,9 $\pm$ 1,1	3,6 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 1,1
	Soporte	-	16,5 $\pm$ 4,3	12,2 $\pm$ 2,7	20,3 $\pm$ 5,9
Ángulo de Contacto ( $^{\circ}$ )		62,14 $\pm$ 2,88	68,93 $\pm$ 2,57	66,28 $\pm$ 1,42	54,59 $\pm$ 0,86

Respecto al tamaño de las grietas, las membranas PAN/G2 poseen las grietas de mayor tamaño, las más anchas, seguidas de las membranas PAN/G10. Las membranas PAN/G15 tienen las grietas más pequeñas. Los datos de tamaño medio de la anchura de las grietas en la superficie se recogen también en la Tabla 2. La funcionalización de las membranas de PAN con grafeno provoca la formación que *crackings* en la superficie de estas, disminuyendo su tamaño a medida que aumenta la cantidad de grafeno.

Analizando el corte transversal de las membranas sintetizadas, Figura 7, presentan una estructura asimétrica, sin embargo, a medida que se incrementa el porcentaje de grafeno incorporado en la matriz polimérica se observa una progresiva deformación de los macroporos que presentaban una estructura de tipo dedo en las PAN/G2 característica de un intercambio de fases disolvente-coagulante rápido durante el proceso de coagulación de las membranas por inversión de fases inducida por coagulante. La sección transversal de la membrana PAN/G2 (Figura 7) muestran una estructura membrana asimétrica con poros pequeños cerca de la superficie (capa selectiva) y poros más grandes de forma alargada en el resto de la membrana (soporte). El corte transversal de PAN/G10 muestra una membrana asimétrica con los poros de la capa selectiva de mayor tamaño, pero los del soporte son de menor tamaño, tanto de forma alargada como redondos. Por último, en el corte transversal de PAN/G15 se observa una membrana un aumento del tamaño de los poros tanto de la capa selectiva como del soporte. Estos datos de tamaño de poro se recogen también en la Tabla 2.

Los resultados de la porosidad en la sección trasversal también aparecen en la Tabla 2. Las membranas PAN/G15 son las que tienen una mayor porosidad debido a un mayor

número de poros repartidos por toda la sección y con poros de mayor tamaño en la zona central. Con una porosidad intermedia siguen las membranas PAN/G2 las cuales poseen poros de un tamaño intermedio en su estructura. Por último, las membranas PAN/G10 son las que menor porcentaje de porosidad presentan.

Analizando los resultados obtenidos en el experimento de ángulo de contacto con agua sobre las membranas (Tabla 2) observamos que todas las membranas presentan un ángulo de contacto inferior a  $90^\circ$ , con lo que se les atribuye un carácter hidrofílico. Se puede observar que al introducir un 2% de grafeno se aumenta ligeramente el ángulo de contacto, lo que puede estar relacionado con la mayor hidrofobicidad del grafeno incorporado, sin embargo, a mayores concentraciones de grafeno, el ángulo de contacto vuelve a disminuir, posiblemente causado por la progresiva disminución en rugosidad superficial de las membranas observado en la Figura 6.

### 3.2. Análisis de la Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier FTIR

En la Figura 8 se muestran los espectros FTIR de las membranas PAN/G0, PAN/G10, de PAN sin procesar y del grafeno en polvo.

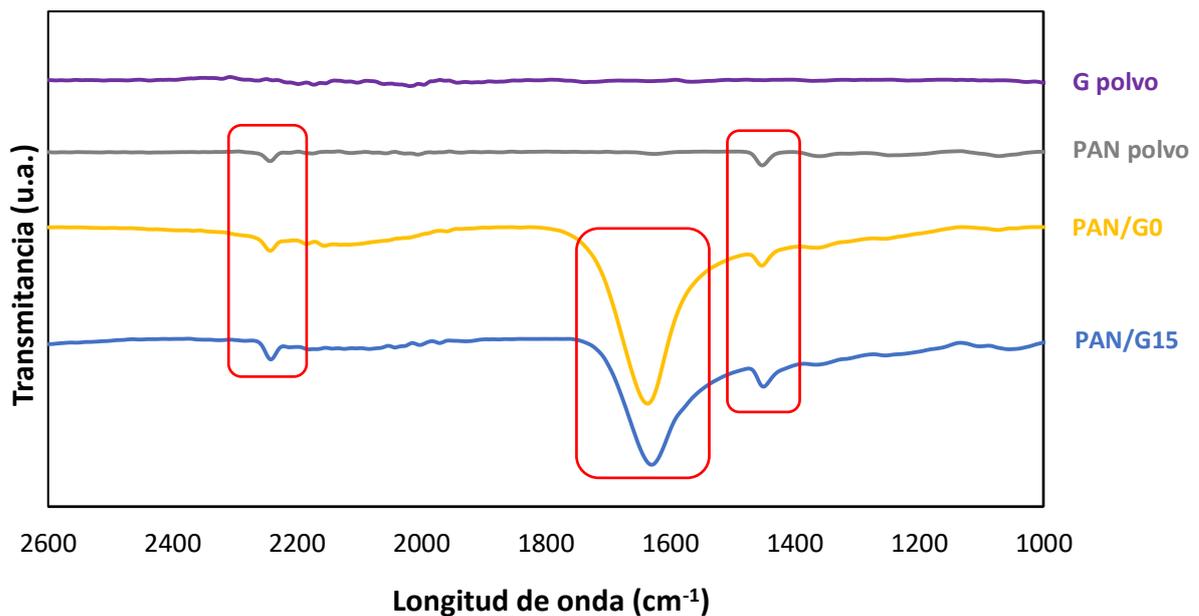


Figura 8: Espectro característico de emisión infrarroja de las muestras analizadas.

En la figura 8, el grafeno en polvo presenta un espectro en el que hay una ausencia de enlaces que produzcan adsorbancia a cualquier longitud de onda del espectro de IRs [44]. El PAN en polvo muestra los picos característicos de los grupos nitrilo ( $-C\equiv N$ ) a  $2240\text{ cm}^{-1}$  y de los grupos metilo ( $-CH_2$ ) a  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Una vez procesado el PAN en forma de membrana, aparece adsorbancia a  $1630\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la presencia de grupos

amida (-N-C=O) [45] y que se asociaría a la posible interacción dipolo-dipolo del disolvente NMP con los grupos nitrilo del PAN formando complejos PAN-disolvente [46]. Por otro lado, no se observa la formación de ningún otro tipo de enlace característico de una posible interacción química entre el PAN y el grafeno.

### 3.3. Caracterización de Flujo de Agua

Después de haber realizado el experimento a varias presiones para cada muestra se calculan sus respectivos flujos y se representan en función de la variación de la presión transmembranal. Sabiendo que la permeabilidad hidráulica se define como el flujo por variación de presión, se obtiene su valor de la pendiente de la recta para cada membrana representados en la Figura 9.

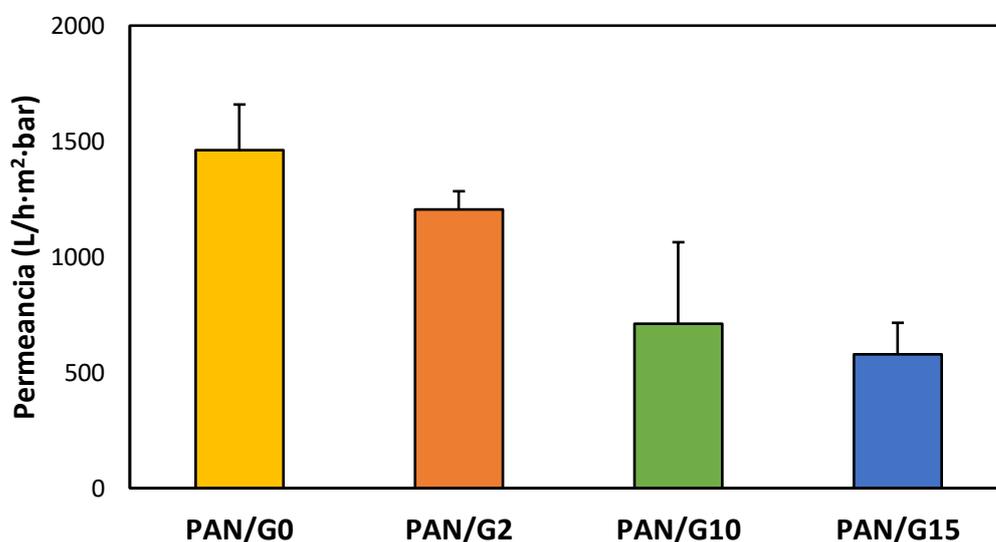


Figura 9: Media y desviación de permeabilidad hidráulica en membranas PAN/G.

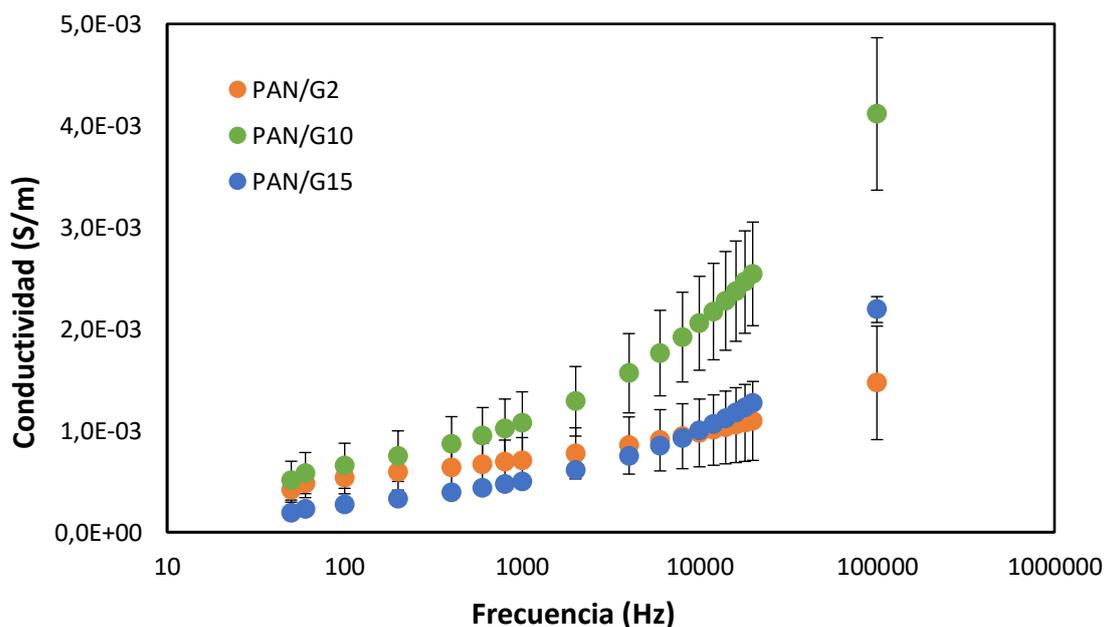
Se puede observar que la membranas más permeables es PAN/G0 ( $1461 \pm 198$  L/h·m<sup>2</sup>·bar) y que la permeancia disminuye progresivamente al incorporar mayores concentraciones de grafeno (PAN/G2  $1205 \pm 353$  L/h·m<sup>2</sup>·bar, PAN/G10  $711 \pm 136$  L/h·m<sup>2</sup>·bar y PAN/G15  $579 \pm 88$  L/h·m<sup>2</sup>·bar), posiblemente atribuido a la mayor hidrofobicidad que incorpora este nanomaterial [47]. Estos valores se pueden explicar a través de la porosidad superficial, una mayor porosidad superficial (PAN/G2) proporciona unas mayores propiedades hidráulicas. Además, el grafeno es un material hidrofóbico, a medida que aumenta su concentración en las membranas PAN/G se obtienen disoluciones poliméricas más viscosas, disminuyendo el tamaño de poro en la superficie, y en consecuencia disminuyendo también el flujo de agua [47]. El óptimo de las propiedades hidráulicas se encuentra en las membranas PAN/G2, siendo similar a la obtenida en la membrana PAN/G. A pesar de la disminución del valor de permeabilidad,

el valor más bajo obtenido para las membranas PAN/G15 es suficiente para conseguir un flujo de nutrientes eficaz ( $250 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2\cdot\text{bar}$ ) [23].

Comparando los valores obtenidos de permeabilidad hidráulica con los encontrados en la literatura, Rekha, S., [48] reportó el valor de permeancia de  $6,62 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2\cdot\text{bar}$  para unas membranas de PAN utilizando como disolvente DMF al 80% wt, mediante la técnica de inversión de fases y agua como baño de coagulación. En comparación con los resultados expuestos en este trabajo, la utilización de NMP como disolvente dio lugar a unas membranas más porosas que el anterior trabajo y unos valores notablemente mayores de permeabilidad hidráulica.

### 3.4. Análisis de Impedancia

Los resultados obtenidos de la conductividad en el experimento de impedancia se recogen en la Figura 10 y se puede apreciar como todas las membranas siguen la misma tendencia, a mayor frecuencia de cambio de potencial, mayor conductividad.

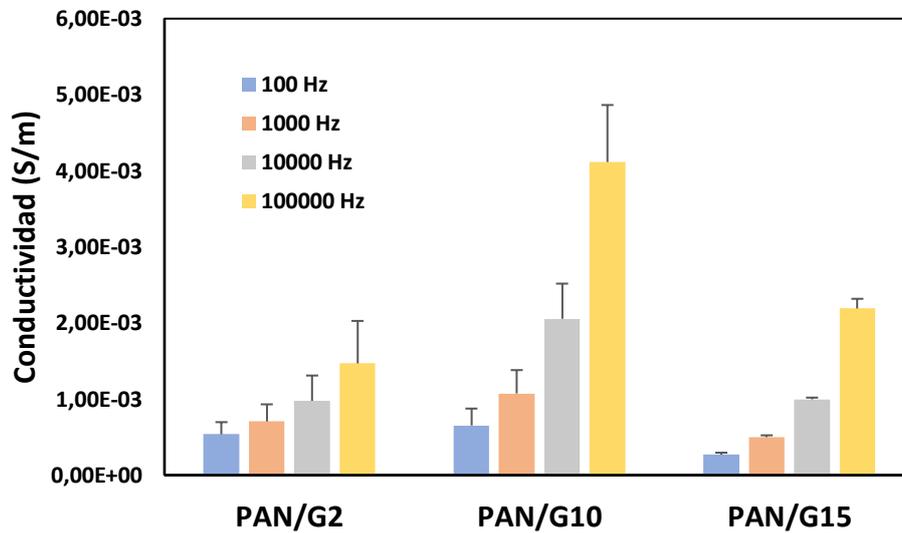


**Figura 10:** Conductividad eléctrica frente a la frecuencia de cambio de potencial eléctrico.

La membrana PAN/G10 es la que reporta los valores más altos de conductividad para unas frecuencias dadas, como se observa en la Figura 10. La membrana PAN/G2 a altas frecuencias no sigue la tendencia general y su conductividad disminuye. Esta variación en la tendencia de PAN/G2 se aprecia tanto en la Figura 10, en el cruce con los valores de PAN/G15 y en la Figura 11, donde la a unas frecuencias de 100, 1000 y 10000 Hz los

valores de conductividad de PAN/G2 son mayores que PAN/G15, y para el valor de 100000 frecuencia la conductividad es más elevada en PAN/G15 que en PAN/G2.

La diferencia entre la conductividad de las membranas es significativa ( $p > 0,05$ ) siendo más acusada a altas frecuencias.

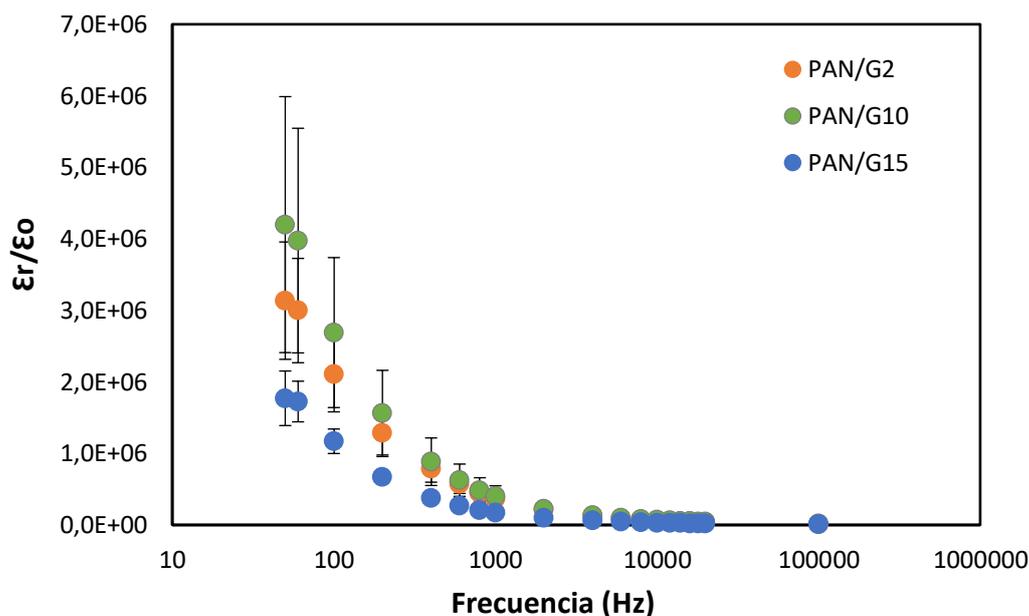


**Figura 11:** Conductividad de las membranas PAN/G del análisis de impedancias a diferentes frecuencias de cambio de potencial.

Mpukuta [49] demuestra en su estudio que añadiendo bajas concentraciones de grafeno en forma de nanopartículas (1, 3 y 5% wt) a las membranas PAN sintetizadas con NMP como disolvente y mediante la técnica de electrospinning, los valores de conductividad obtenidos son superiores en comparación con los de las membranas PAN sin nanopartículas.

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados de la literatura se puede afirmar que el aumento de grafeno (hasta 10% wt) en la matriz polimérica de las membranas PAN supone un aumento de sus propiedades eléctricas.

En la Figura 12 se muestra que a medida que aumenta la frecuencia la permitividad dieléctrica relativa va disminuyendo y todas las membranas siguen esta misma tendencia.



**Figura 12:** Permitividad dieléctrica relativa entre la permitividad del vacío frente a la frecuencia de cambio de potencial eléctrico.

Para cada frecuencia dada la membrana PAN/G10 obtiene los valores de permitividad más elevados, seguido de las membranas PAN/G2. Las membranas PAN/G1 y PAN/G15 presentan los valores más bajos. A medida que aumenta la frecuencia, la permitividad disminuye un orden de magnitud su valor.

Las propiedades dieléctricas de los tejidos biológicos se han venido estudiando desde hace años, lo que ha permitido obtener importante información sobre la estructura, y composición de los tejidos [50]. Numerosos estudios han demostrado la importancia del estímulo químico y físico para inducir la correcta diferenciación y migración celular. Dada es la importancia de la interacción de los tejidos biológicos con la energía electromagnética que ciertas células poseen, endógenamente, campos eléctricos de corriente continua (dcEFs) formando, por ejemplo, potenciales epiteliales transcelulares o potenciales neuronales, esenciales para la correcta funcionalidad biológica del tejido. Además, ciertos tipos celulares modifican su movimiento direccional en respuesta a dcEFs ectópicos, un fenómeno que se conoce como galvanotaxis [51]

### 3.5. Análisis TGA

La Figura 13 muestra el perfil de TGA obtenido de las membranas PAN/G. Este perfil es característico una descomposición multietapa, al aumentar la temperatura se aprecia una primera pérdida de peso significativa en torno a 300 °C, seguida de una descomposición continuada.

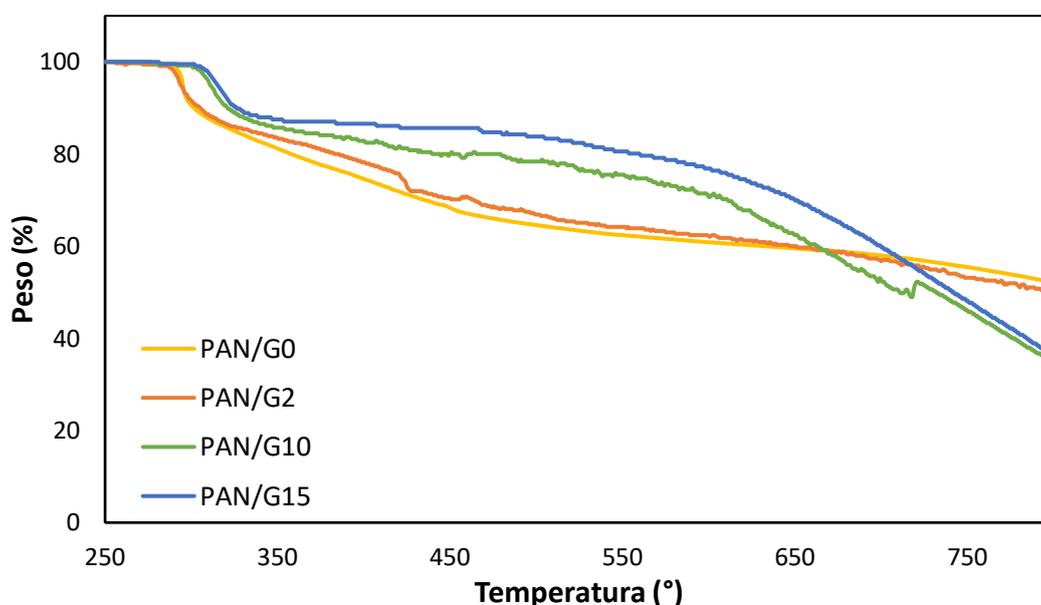


Figura 13: Análisis termogravimétrico de las membranas PAN/G.

La Tabla 5 muestra las temperaturas características del TGA de las membranas analizadas.

Tabla 3: Temperaturas características del TGA para las membranas PAN/G.

Membranas	Primera Etapa		Segunda Etapa	
	$T_{onset}$ (°C)	$T_{max}$ (°C)	$T_{onset}$ (°C)	$T_{max}$ (°C)
PAN/G0	290,08	323,08	489,59	802,2
PAN/G2	294,66	309,02	499,51	808,1
PAN/G10	300,98	324,77	479,42	808,47
PAN/G15	301,83	327,45	476,14	807,94

Cuando la temperatura alcanza los unos 300°C ( $T_{onset}$ ) se observa una pérdida de peso significativa y bastante rápida debida a la deshidrogenación de los grupos nitrilo [52] que libera gases nitrogenados como  $NH_3$  y  $HCN$  [53] y que alcanza su velocidad máxima de descomposición alrededor de 323°C para las membranas PAN/G0. Sin embargo, la incorporación de grafeno en la matriz polimérico provoca la drástica reducción de la  $T_{max}$  observada en esta primera etapa de degradación térmica hasta aproximadamente 309 °C para PAN/G2 y una ligera recuperación hasta 324 y 327°C respectivamente para PAN/G10 y PAN/G15. Esta primera pérdida de peso es más brusca en las membranas

PAN/G2, volviendo a ser similar a las de las membranas PAN/GO, y más suave para las membranas PAN/G10 y PAN/G15.

La segunda etapa, es una pérdida de peso constante, producida por la fragmentación de las cadenas poliméricas y liberando especies volátiles [52]. Para las membranas PAN/GO y PAN2 esta pérdida de peso comienza a unas  $T_{\text{onset}}$  de 489 °C y 499 °C, respectivamente, mientras que para las PAN/G10 y PAN/G15 se adelantan a 479°C y 476°C respectivamente, y es una pérdida mucho más brusca y rápida.

Se puede apreciar como la funcionalización de las membranas PAN con un alto porcentaje de grafeno acelera la descomposición de las membranas. Sin embargo, comparando estos resultados con los obtenidos por Rejero, J. [53], en general la incorporación de grafeno en las membranas PAN provoca una mayor estabilidad térmica que las dopadas con GO, amortiguando las pérdidas de peso de las cadenas poliméricas.

### **3.5. Análisis de la Biocompatibilidad de las membranas PAN/G**

En la segunda parte del presente trabajo se ha analizado la biocompatibilidad de las membranas PAN/G sintetizadas mediante inversión de fases. Para ello, se han realizado cultivos celulares sobre la superficie de las siguientes membranas seleccionadas, PAN/GO, PAN/G2 y PAN/G10 utilizando un cristal como control y analizado si la funcionalización con grafeno afecta a la respuesta celular. Se han descartado las membranas PAN/G15 porque PAN/G10 presentaba óptimas propiedades electroconductoras y mayores valores de permeabilidad hidráulica y porosidad superficial con lo que se puede considerar como el soporte óptimo para el análisis de influencia del comportamiento celular en el presente trabajo. En particular, se han realizado ensayos de adhesión, diferenciación, citotoxicidad y morfológicos.

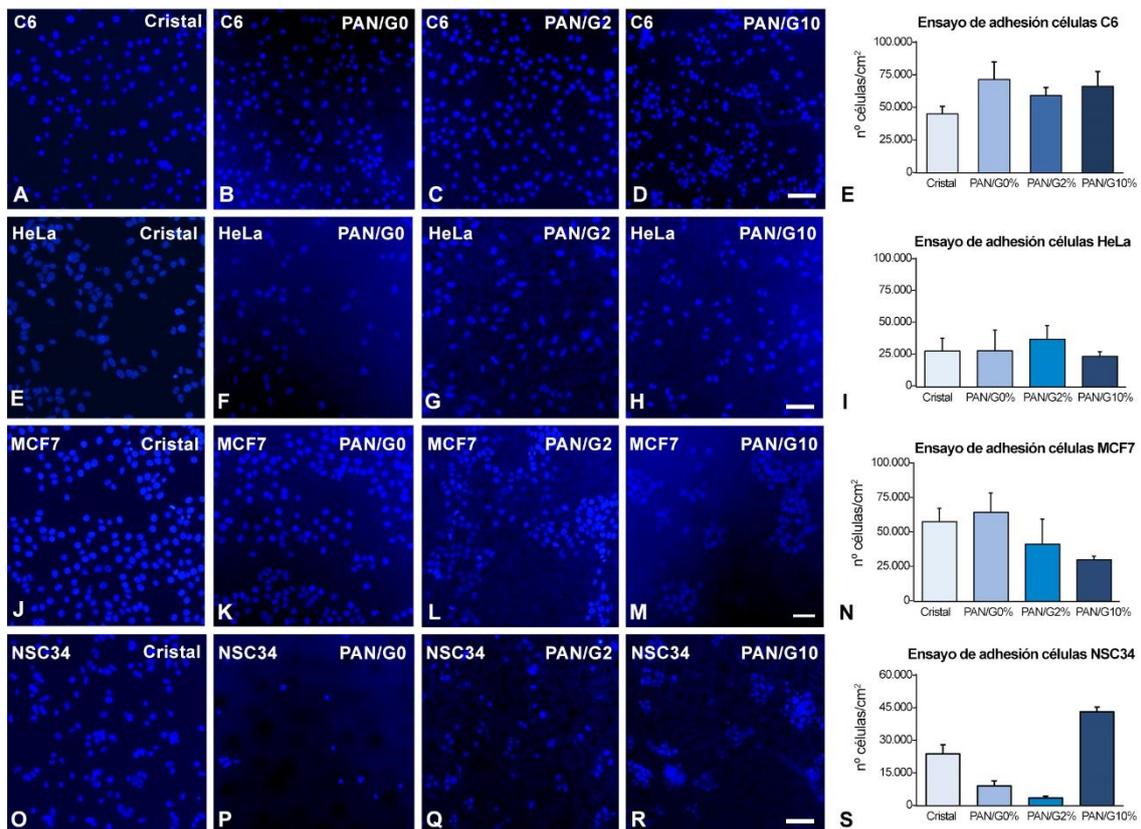
#### **3.5.1. Ensayo de Adhesión Célula-Matriz**

La adhesión y el crecimiento celular sobre biomateriales depende de su capacidad de establecer uniones con la matriz extracelular y, por tanto, de las características superficiales del biomaterial.

Con objeto de investigar la capacidad de adhesión célula-matriz extracelular se realizaron ensayos de adhesión utilizando las líneas celulares C6, NSC34, MCF7 y HeLa. Para ello, las células fueron sembradas e incubadas en medio DMEM durante 24 horas a 37 °C. Las células fueron fijadas y se realizó la tinción con DAPI de los núcleos de las células adheridas. El número medio de células por área de superficie presentes sobre el cristal y las membranas PAN se analizó mediante el recuento directo utilizando 3 imágenes de fluorescencia de cada tipo de cultivo.

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión de cada una de las líneas celulares al cristal (control), membranas PAN/G, PAN/G2 y PAN/G10. El análisis de los resultados reveló que las células C6 y HeLa no presentan cambios significativos en su capacidad de adhesión celular con la matriz extracelular independientemente de la naturaleza de la superficie del sustrato (cristal o PAN/G). En el caso de las MCF7, el PAN por sí mismo no influye en su capacidad de adhesión mientras que la presencia de grafeno reduce ligeramente el número de células presentes en estas membranas. Finalmente, la capacidad de adhesión de las células NSC34 se vio muy disminuida en membranas PAN sin o con bajo porcentaje de grafeno (PAN/G0 y PAN/G2) y, únicamente en las membranas PAN/G10 se ha recuperado la capacidad de adhesión de las células NSC34.

Cabe destacar, que los núcleos de las células MCF7 y NSC34 crecidas sobre la superficie de membranas PAN funcionalizadas con grafeno (PAN/G2 y PAN/G10) presentan una distribución no homogénea y aparecen formando acúmulos de núcleos celulares.



**Figura 15:** Ensayo de adhesión en cristal y membranas PAN/G de las líneas celulares C6 (A-D), NSC34 (F-I), MCF7 (K-N) y HeLa (P-S). (E, J, O, T) Gráficos comparativos del número total de células por cm<sup>2</sup> presentes en los distintos sustratos. Barras de medida 50µm.

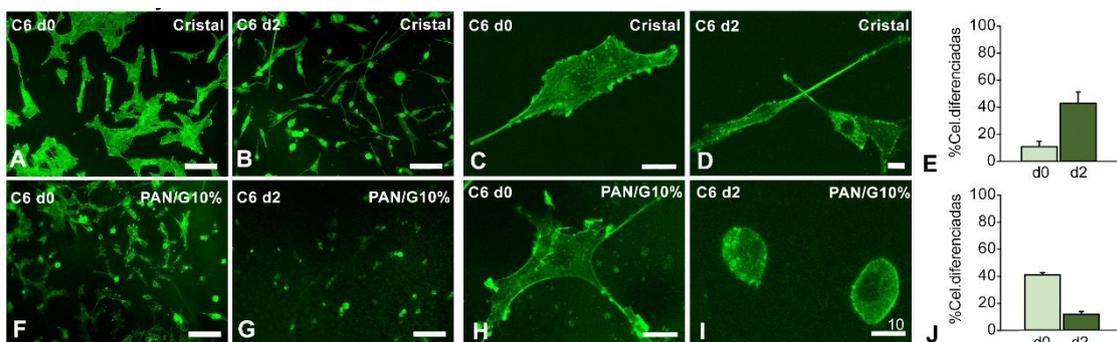
### 3.5.2. Ensayo de Diferenciación Celular

Estudios previos del laboratorio habían demostrado que el dopaje de membranas PCL con un 20% de óxido de grafeno reducido estimulaba la diferenciación a astrocito-like

de la línea celular C6 [54]. Por esta razón se ha decidido estudiar si en las membranas PAN funcionalizadas con 2 y 10% de grafeno la respuesta celular a la diferenciación celular *in vitro* es similar.

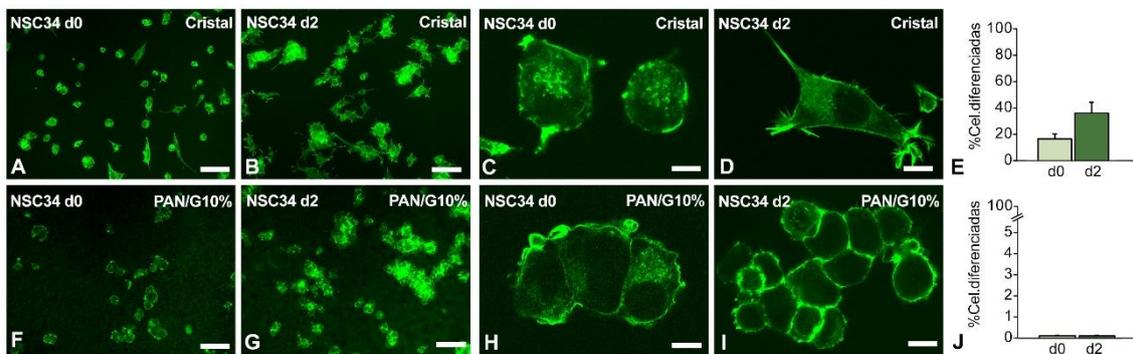
Para llevar a cabo este ensayo utilizamos dos líneas celulares C6 y NSC34. Las células C6 proceden de un glioma de rata y su diferenciación astrocítica es inducida por el tratamiento con 1mM dbcAMP durante 2 días. Las células diferenciadas son fusiformes y emiten múltiples procesos mientras que las no diferenciadas son muy aplanadas y poligonales [55]. Por su parte, NSC34 es una línea celular obtenida por la fusión de células embrionarias de la médula espinal de ratón y de neuroblastoma de ratón. Éstas adquieren la morfología de motoneuronas cuando el medio donde crecen está libre de suero. En este trabajo el proceso de diferenciación fue llevado a cabo durante dos días, aunque la diferenciación se completa a los 5 días. Se han considerado "células diferenciadas" cuando las mismas poseen procesos (C6) o neuritas (NSC34) de una longitud mayor a la del cuerpo celular. Las células que después del proceso de diferenciación siguen teniendo un aspecto poligonal o esférico se han considerado "células no diferenciadas".

El ensayo de diferenciación de las células C6 reveló como, en el cristal, el porcentaje de células diferenciadas aumenta de manera significativa tras 48 horas de la adición de 1mM dbcAMP al medio de cultivo (Figura 14A, B y E). El detalle demuestra la morfología fusiforme típica de una célula C6 en cristal (Figura 14C), mientras que al diferenciarse su cuerpo celular se reduce y se forman procesos astrocíticos (Figura 14D). Sin embargo, la diferenciación de las células C6 crecidas sobre membranas PAN/G10 fue dramáticamente inhibida. Observamos que, 24 horas después de la siembra, un alto porcentaje de células habían comenzado a diferenciar a astrocitos espontáneamente (Figura 14F y H). Este proceso se vio interrumpido al añadir dbcAMP a el medio de cultivo y las células se vuelven esféricas y sin emisión de procesos (Figura 14G e I). Por lo tanto, podemos concluir que las membranas PAN/G10 no permiten la correcta diferenciación de las células C6 a astrocitos.



**Figura 14:** Imágenes microscópicas panorámicas (objetivo 20X) y en detalle (objetivo 63X), de células C6 marcadas con Falloidina-FITC durante proceso de diferenciación a astrocitos, sobre cristal (A-D) o membranas PAN/G10 (F-I). Análisis cuantitativo del porcentaje de células diferenciadas presentes en cristal (E) y en membranas PAN/G10 (J) durante el ensayo de diferenciación. Barra de medida: 50µm (A, B, F-I) y 10µm (C-D, H-I).

En el caso de las NSC34, el ensayo revela que, sobre cristal, las células comienzan el proceso de diferenciación a neuronas-motoras caracterizado por cambios morfológicos, pasando de observarse células poligonales a día 0 (Figura 15A, C) a formas más "estrelladas" que exhiben formación de neuritas de pequeño tamaño (Figura 15B, D). El análisis cuantitativo demostró que el porcentaje de células diferenciadas en el cristal se duplica a día 2 (d2) de diferenciación (Figura. 15E). Por su parte, las células diferenciadas sobre membranas PAN/G10 se observaron cambios morfológicos muy importantes si se comparan con el control (cristal). A día 0 (d0), las células son muy redondeadas y forman grupos íntimamente asociados de 3-5 células. Además, 48 horas después de comenzar el proceso de diferenciación, se observaba una reducción del tamaño celular y formando agrupaciones celulares de varias decenas de células. La proporción del número de células diferenciadas fue inapreciable tanto en condiciones normales como inducidas (Figura 15J)



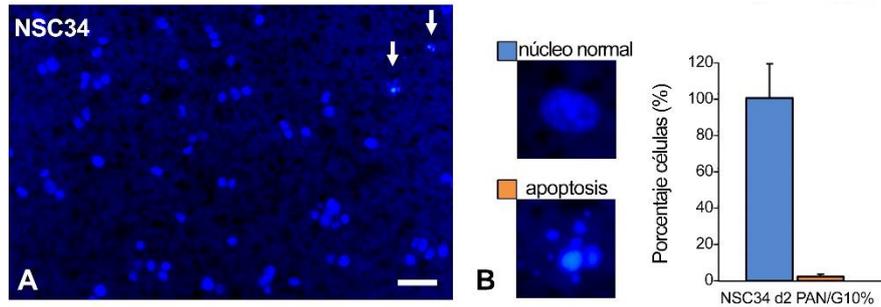
**Figura 15:** Imágenes microscópicas panorámicas (objetivo 20X) y en detalle (objetivo 63X), de células NSC34 marcadas con Falloidina-FITC durante proceso de diferenciación a motoneuronas sobre cristal (A-D) o membranas PAN/G10 (F-I). (Análisis cuantitativo del porcentaje de células diferenciadas presentes en cristal (E) y en membranas PAN/G10 (J) durante el ensayo de diferenciación. Barra de medida: 50µm (A-B, F-I) y 10µm (C-D, H-I).

### 3.5.3. Ensayo de Citotoxicidad

A continuación, quisimos conocer si el cambio de fenotipo de las células NCS34 crecidas sobre la membrana PAN/G10 se debía a la activación de procesos que conducen a la degeneración celular. El proceso de muerte celular programada o apoptosis se caracteriza por la condensación del citoplasma, fragmentación del ADN, adquisición por parte de las células de formas redondeadas y, finalmente, formación de cuerpos apoptóticos característicos (Figura 16B).

En este ensayo se ha querido conocer si las membranas PAN/G10 inducen procesos de apoptosis en las células NSC34. El recuento de cuerpos apoptóticos utilizando imágenes panorámicas de NSC34 diferenciadas sobre membranas PAN/G10 marcadas con DAPI (Figura 16A), demostró que el porcentaje de células apoptóticas no superaba el 2% (Figura 16B). Este resultado nos permite concluir que el cambio morfológico observado,

tanto en condiciones normales como tras la diferenciación de células NSC34, no se debe a procesos de muerte celular programada.

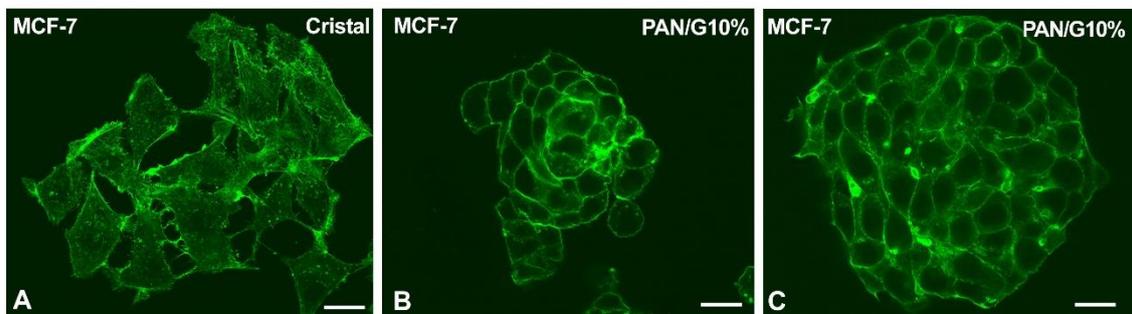


**Figura 16:** Ejemplo de un núcleo apoptótico(A). Ensayo de citotoxicidad en las células NSC34 (B). Barra de medida 50  $\mu$ m

### 3.5.4. Análisis Morfológico

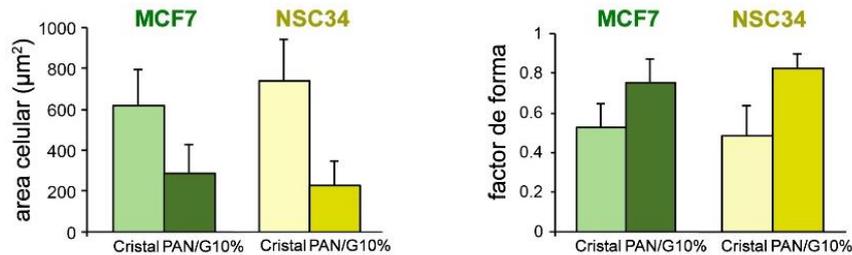
Los resultados del ensayo de adhesión han revelado que tanto las células MCF7 como las NSC34 formaban agregados celulares cuando crecían sobre membranas PAN dopadas con grafeno 2% y 10%, siendo la última condición la más favorable para analizar este fenómeno en detalle.

Utilizando el marcaje de la corteza de actina y microscopía confocal, realizamos un análisis de la morfológico de las células NSC34 (Figura 15I) y MCF7 (Figura 17B-C) crecidas sobre membranas PAN/G10%. Como observamos en la figura, las MCF7, una línea de cáncer derivada de un adenocarcinoma de mama humano, son células poligonales que crecen individualizadas pero estableciendo ciertos contactos puntuales intercelulares (Figura 17A). Sin embargo, cuando se realiza el cultivo de estas células sobre las membranas PAN/G10 su morfología cambia drásticamente a formas aparentemente más reducidas, redondeadas y que establecían largas uniones intercelulares formando, en su conjunto, "islotos celulares".



**Figura 17:** Imágenes de células MCF7 marcadas con Falloidina-FITC durante su crecimiento en cristal (A) y membranas PAN/G10 (B-C). Barra de medida 20 $\mu$ m.

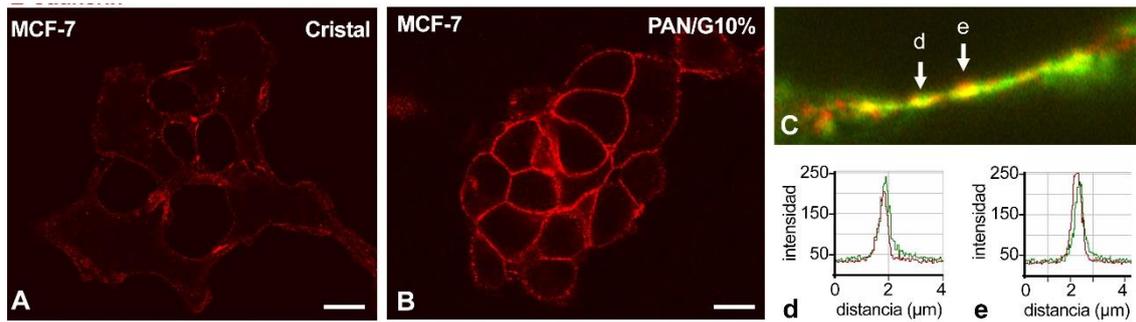
A continuación, se llevó a cabo un ensayo cuantitativo para conocer hasta qué grado el crecimiento sobre PAN/G10 ha modificado la morfología de las células MCF7 y NSC34 en comparación con el cristal. Los gráficos representados en la Figura 18, confirman la reducción del área total celular, así como la tendencia a adquirir una forma redondeada en ambas células, demostrada por el cálculo de factor de forma o coeficiente de circularidad. Cuando el factor de forma  $>0,9$  la célula se considera circular, mientras que si es  $<0,9$  la célula es alargada o con otra deformación.



**Figura 18:** Análisis morfológico para determinar el cambio en área y circularidad de las células MCF7 y NSC34 en PAN/G10.

### 3.5.5. Ensayo de Adhesión Célula-Célula

Una vez definido que el crecimiento de las células NSC34 y MCF7 sobre membranas PAN/G10 resulta en la formación de "islotos celulares", el siguiente objetivo fue analizar si en las uniones célula-célula participan proteínas implicadas en adhesión celular. En este trabajo, se ha analizado la E-cadherina que en los epitelios se localiza en las uniones adherentes estableciendo puentes intercelulares y que, interacciona con la familia de las cateninas y éstas con los filamentos de actina del citoesqueleto. Por esta razón, utilizando anticuerpos específicos que reconocen esta proteína y microscopía confocal, se puede observar la localización exacta de la E-cadherina delineando las uniones célula-célula de los islotos celulares presentes en las membranas PAN/G10 (Figura 19B) mientras que en condiciones normales la E-cadherina se localiza en zonas puntuales de contacto intercelular (Figura 19A). Además, tal y como demuestra el análisis de perfiles de los canales de fluorescencia de la E-cadherina (rojo) con la F-Actina (verde) ambas moléculas se concentran en regiones discretas a lo largo de todo el contorno celular (Figura 19C, d y e).



**Figura 19:** Imágenes del ensayo de adhesión célula-célula en las MCF7 (A-B). Barra de medida 10μm. Análisis de perfiles de los canales de fluorescencia E-cadherina y F-actina (C, d, e).

Este resultado podría tener un gran impacto biomédico dado que el contacto de las células de cáncer de mama y de neuroblastoma con las membranas PAN/G10 inhibe su proliferación y promueve su diferenciación a un fenotipo epitelial adhesivo formando "islotos celulares epiteliales". Estos resultados invitan a investigar los mecanismos que subyacen en esta alteración del destino celular por parte de este material. Se abre la hipótesis de que el sustrato PAN funcionalizado con grafeno promueve a reprogramación celular a través de la activación de una transición mesénquima-epitelio (MET). Un posible mecanismo podría deberse a la regulación transcripcional de la E-cadherina, principal componente de las uniones adherentes y que actúa como gen supresor de tumores al evitar la invasividad de la célula cancerígena. De hecho, cuando se fuerza la expresión de la E-cadherina en ciertos carcinomas invasivos se inhibe su capacidad de invadir y de hacer metástasis; inversamente, el bloqueo de la función de la E-cadherina en tumores no invasivos activa su capacidad metastásica [56].

#### 4. CONCLUSIONES Y FUTUROS TRABAJOS

En el presente trabajo se han sintetizado membranas de poliacrilonitrilo (PAN) funcionalizadas con altas concentraciones de grafeno con el fin de analizar las posibles mejoras en sus propiedades y estudiar su efecto como soporte en diferentes líneas celulares. Se sintetizaron membranas de PAN 10% wt con diferentes concentraciones de grafeno, 0, 2, 10 y 15% wt y utilizando NMP como disolvente, mediante la técnica de inversión de fases, utilizando como baño de coagulación una disolución agua/NMP al 80/20% v/v.

Mediante la microscopía SEM se analizaron sus propiedades morfológicas donde destacó la membrana PAN/G15 por su elevada porosidad en la sección transversal. Se observó que una a mayor concentración de grafeno las superficies de las membranas se volvían más lisas. Este dato coincide con los resultados del experimento de ángulo de contacto, donde a pesar de que el grafeno es un material hidrofóbico, las membranas PAN/G con altas cantidades de grafeno presentan un carácter más hidrofílico, por poseer una superficie más lisa.

En el análisis FTIR de las muestras no se observaron diferencias significativas en la estructura de las membranas, ninguna de ellas mostraba picos característicos del grafeno y las variaciones de intensidad de los picos son debido a reacciones de ciclación y deshidrogenación de PAN.

Las membranas sin funcionalizar PAN/G0 destacaron por sus propiedades hidráulicas, obteniendo el valor más alto de permeabilidad hidráulica y a medida que aumentaba la concentración de grafeno la permeancia disminuye. A pesar de la disminución del valor de permeabilidad, el valor más bajo obtenido para las membranas PAN/G15 es suficiente para conseguir un flujo de nutrientes eficaz.

Respecto a los resultados de conductividad eléctrica se esperaba obtener que a mayor concentración de grafeno las propiedades eléctricas de las membranas aumentarían. Se obtuvo un óptimo de las propiedades eléctricas en las membranas PAN/G10, en términos de conductividad y permitividad dieléctrica.

En lo referente a las propiedades térmicas, al aumentar la concentración de grafeno en las membranas se observó una descomposición acelerada a altas temperaturas.

Los resultados de biocompatibilidad de las membranas PAN/G10 con las células C6, procedentes de un glioma de rata, revelan que este soporte inhibe la diferenciación de las células C6 a astrocitos.

Tanto en las células NSC34, procedentes de un neuroblastoma de rata, y las MCF7, procedentes de cáncer de mama, el crecimiento sobre las membranas PAN/G10 provoca importantes cambios morfológicos, inhibe su capacidad de migración y promueve su diferenciación a un fenotipo epitelial adhesivo reagrupándolas en "islotos celulares".

Se abre la hipótesis de que el sustrato PAN funcionalizado con una alta concentración de grafeno PAN/G10 promueve una reprogramación celular a través de la activación de una transición mesénquima-epitelio (MET), evitando así la migración de las células cancerosas y la consecuente proliferación del cáncer.

En el presente trabajo, el notable incremento de las propiedades electroactivas de permitividad dieléctrica de las membranas PAN/G nos invitan a pensar que dichas propiedades están modificando, a través de un mecanismo desconocido, la capacidad de diferenciación y migratoria de las células cancerígenas MCF-7 (de origen epitelial) y las NSC34 (de origen neuronal). Esta hipótesis será estudiada en profundidad en subsiguientes trabajos.

Se propone como futuros trabajos el estudio mecanístico que explique la formación de “islotos celulares epiteliales” en otras líneas celulares y su impacto biomédico en el área de la oncología. Además de estudiar más en profundidad si las propiedades que incorpora el grafeno a la membrana están relacionadas con su elevada electroconductividad.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] RAHAMAN, M.; ISMAIL, A.; MUSTAFA, A. 2007. *A review of heat treatment on polyacrylonitrile fiber*. *Polymer Degradation and Stability*, **92**(8), pp. 1421-1432. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.03.023>
- [2] KERSHAW, P. 2015. *Biodegradable Plastics and Marine Litter. Misconceptions, concerns and impacts on marine environments*. Nairobi: UNEP (United Nations Environment Programme). ISBN: 978-92-807-3494-2
- [3] WANG, Q. et al. 2012. *Nanostructures and Surface Nanomechanical Properties of Polyacrylonitrile/Graphene Oxide Composite Nanofibers by Electrospinning*. *Journal of Applied Polymer Science*, **128**, pp. 1152-1157. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/app.38273>
- [4] IGTPAN (Granado Polyacrylonitrile Technology Institute). 2016. *Polyacrylonitrile Applications*. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <http://www.igtpan.com/Ingles/aplicacoes.asp>
- [5] NIH (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering). *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>
- [6] DEL BARRIO, L. 2016. *Estudio de la utilización de agentes preservantes durante la fabricación de membranas de poli (ε-caprolactona) en sus propiedades de transporte de nutrientes en biorreactores para ingeniería tisular*. Diban, N (dir). Trabajo Fin de Grado. Universidad de Cantabria. Disponible en UCreá: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/8215>
- [7] SALEHI-NIK, N et al. 2013. *Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering*. *BioMed Research Internationa* (ID 762132). Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2013/762132>
- [8] KOROSSIS, S. 2005. *Bioreactors in tissue engineering*. *Topics in Tissue Engineering* vol 2, Chapter 8, pp 1-23. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: [https://www.oulu.fi/spareparts/ebook\\_topics\\_in\\_t\\_e\\_vol2/](https://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol2/)
- [9] PAPPENBURG, B. et al. 2010. *A facile method to fabricate poly(l-lactide) nano-fibrous morphologies by phase inversion*. *Acta Biomaterialia*, **6**(7), pp. 2477-2483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.051>
- [10] DALBY, M. et al. 2004. *Rapid fibroblast adhesion to 27 nm high polymer demixed nano-topography*. *Biomaterials*, **25**(1), pp. 77-83 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00475-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00475-7)

- [11] SÁNCHEZ, S. 2019. *New biocompatible polymer membranes functionalized with graphene based nanomaterials for in vitro neural models*. Urtiaga, A.; Diban, N. (dirs.) Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria. Disponible en UCrea: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/16196>
- [12] ISMAIL, A.; NORIDA, R. Y SUNARTI, A. 2002. *Latest development on the membrane formation for gas separation*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, **24**, pp. 1025-1043. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/24-Suppl-1/28gas-separation.pdf>
- [13] MORELLI, S. et al. 2011. *PAN hollow fiber membranes elicit functional hippocampal neuronal network*. Journal of Materials Science Materials in Medicine, **23**(1), pp. 149-56. DOI: [10.1007/s10856-011-4484-3](https://doi.org/10.1007/s10856-011-4484-3)
- [14] MORELLI, S. et al. 2012. *Flat and tubular membrane systems for the reconstruction of hippocampal neuronal network*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, **6**(4), pp. 299-313. DOI: <https://doi.org/10.1002/term.434>
- [15] O'BRIEN, F. 2011. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials Today, **14**, pp. 88-95. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- [16] HOLMES, B. 2016. *Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation in electrospun constructs with carbon nanomaterials*. Carbon, **97**, pp. 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.12.035>
- [17] KUMAR, S. et al. 2016. *3D scaffold alters cellular response to graphene in a polymer composite for orthopedic applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part B, **104**, pp. 732-749. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33549>
- [18] GOENKA, S.; SANT, V. y SANT, S. 2014. *Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering*. Journal of Controlled Release, **173**, pp. 75-88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.017>
- [19] HITSCHERICH, P. et al. 2018. *Electroactive graphene composite scaffolds for cardiac tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research, **106**(11), pp. 2923-2933. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36481>
- [20] RYON, S. et al. 2016. *Graphene-based materials for tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, **105**, pp. 255-274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.007>
- [21] LORENZONI, M. et al. 2013. *Simple and effective graphene laser processing for neuron patterning application*. Scientific Reports, **3**, 1945. DOI: [10.1038/srep01954](https://doi.org/10.1038/srep01954)
- [22] MAHMOUDIFARD, M. et al. 2016. *The different fate of satellite cells on conductive composite electrospun nanofibers with graphene and graphene oxide nanosheets*. Biomedical Materials, **11**, 025006. DOI: [10.1088/1748-6041/11/2/025006](https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/2/025006)

- [23] DIBAN; N. et al. 2017. *Facile fabrication of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/graphene oxide membranes for bioreactors in tissue engineering*. Journal of Membrane Science, **540**, pp. 219-228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.06.052>
- [24] 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*, **18**(11). DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.201800195>
- [25] UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA (Servicio de Microscopía Electrónica). 2017. *Preparación de muestras para el microscopio de barrido*. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: <http://www.upv.es/entidades/SME/info/753330normalc.html>
- [26] Buckman, J. et al. 2017. *Quantifying Porosity through Automated Image Collection and Batch Image Processing: Case Study of Three Carbonates and an Aragonite Cemented Sandstone*. *Geosciences*, **7**(3), 70. DOI: <https://doi.org/10.3390/geosciences7030070>
- [27] Ziel, R.; Haus, A y Tulk, A. 2008. *Quantification of the pore size distribution (porosity profiles) in microfiltration membranes by SEM, TEM and computer image analysis*. *Journal of Membrane Science* **323**, pp. 241–246. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: <https://kundoc.com/pdf-quantification-of-the-pore-size-distribution-porosity-profiles-in-microfiltratio.html>
- [28] Chandler, D. 2013. *Explained: Hydrophobic and hydrophilic*. MIT (Massachusetts Institute of Technology) News. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: <http://news.mit.edu/2013/hydrophobic-and-hydrophilic-explained-0716>
- [29] FBK-FMPS (Functional Materials and Phototronics Structures). 2014. *Contact Angle platform*. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: <https://fmeps.fbk.eu/contact-angle-platform>
- [30] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Conceptos básicos de FTIR*. [Consulta: mayo 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>
- [31] ANDREAH (Análisis No Destructivo para el Estudio in situ del Arte, la Arqueología y la Historia). *Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)*. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: [http://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas\\_equipos/ftir.html](http://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas_equipos/ftir.html)
- [32] UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID. *Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR)*. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: <https://www.ucm.es/tecnicasgeologicas/espectroscopia-de-infrarrojos-ftir>

- [33] Diban, N. et al. 2014. *Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Films with Favourable Properties for Neural Cell Growth*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **14**, pp. 2743-2749. DOI: 10.2174/1568026614666141215153932
- [34] Heaney, M. 2003. Electrical Conductivity and Resistivity. En: Webster, J. (ed). *Electrical Measurement, Signal Processing, and Displays*. Florida: CRC Press, pp 7-14. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/309188334\\_Electrical\\_Conductivity\\_and\\_Resistivity](https://www.researchgate.net/publication/309188334_Electrical_Conductivity_and_Resistivity)
- [35] MOHAMAD, N. 2018. *Thermogravimetric Analysis of Polymers*. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, pp. 1-29. DOI: 10.1002/0471440264.pst667
- [36] Dean, D. *Thermal Gravimetric Analysis*, University of Alabama at Birmingham. [Consulta: mayo 2019]. Disponible en: <https://docplayer.net/34025379-Thermal-gravimetric-analysis-derrick-dean-university-of-alabama-at-birmingham.html>
- [37] ATCC (American Type Culture Collection). 2016. *C6 (ATCC® CCL-107™)*. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-107.aspx#characteristics>
- [38] Matusica, D. 2007. *Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of neurotrophin receptor trafficking*. *Journal of Neuroscience Research*, **86**, pp. 553-565. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jnr.21507>
- [39] ATCC (American Type Culture Collection). 2016. *MCF7 (ATCC® HTB-22™)*. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx#generalinformation>
- [40] ATCC (American Type Culture Collection). 2016. *HeLa (ATCC® CCL-2™)*. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-2.aspx#generalinformation>
- [41] MERCK KGaA. 2019. *Cell Dissociation with Trypsin*. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-dissociation-with-trypsin.html>
- [42] THERMOFISHER SCIENTIFIC. *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)*. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>
- [43] Olson, E. 2011. *Shape factors and their use in image analysis—part 1: theory*. *Journal of GXP Compliance*, **15**, pp. 85-96. [Consulta: junio 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/303206441\\_Shape\\_factors\\_and\\_their\\_use\\_in\\_image\\_analysis-part\\_1\\_theory](https://www.researchgate.net/publication/303206441_Shape_factors_and_their_use_in_image_analysis-part_1_theory)

- [44] KUAN, C. et al. 2018. *Characterization and Properties of Graphene Nanoplatelets/XNBR Nanocomposites*. *Polymers & Polymer Composite*, **26**, 1. DOI: <https://doi.org/10.1177/096739111802600107>
- [45] LEE, S. et al. 2012. *Synthesis and properties of thermally reduced graphene oxide/polyacrylonitrile composites*. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **73**, pp. 741-743. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2012.01.015>
- [46] WU, Q. Y. et al. 2012. *Interactions Between Polyacrylonitrile and Solvents: Density Functional Theory Study and Two-Dimensional Infrared Correlation Analysis*. *Journal of Physical Chemistry B*, **116**(28), pp. 8321-7330. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp304167f>
- [47] MULDER, M. 1996. *Basic principles of membrane technology*. 2<sup>a</sup> ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. ISBN: 0-7923-4248-8
- [48] REKHA, S. y DE, S. 2015. *Preparation, characterization and antifouling properties of polyacrylonitrile/polyurethane blend membranes for water purification*. *RSC Advances*, **5**, pp. 23599-23612. DOI: [10.1039/C5RA00736D](https://doi.org/10.1039/C5RA00736D)
- [49] MPUKTA, O. 2018. Investigation of electrical conductivity of nanofibers (pan) containing nanoparticles (graphene, copper, silica) produced by electrospinning method. Dincer, K. (dir.). Tesis MSc. Universidad de SELCUK. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/326983844\\_INVESTIGATION\\_OF\\_ELECTRICAL\\_CONDUCTIVITY\\_OF\\_NANOFIBERS\\_PAN\\_CONTAINING\\_NANOPARTICLES\\_GRAPHENE\\_COPPER\\_SILICA\\_PRODUCED\\_BY\\_ELECTROSPINNING\\_METHOD](https://www.researchgate.net/publication/326983844_INVESTIGATION_OF_ELECTRICAL_CONDUCTIVITY_OF_NANOFIBERS_PAN_CONTAINING_NANOPARTICLES_GRAPHENE_COPPER_SILICA_PRODUCED_BY_ELECTROSPINNING_METHOD)
- [50] KUANG, W. y NELSON, S. 1998. *Low-frequency dielectric properties of biological tissues: a review with some new insights*. *Transaction of the ASAE*, **41**(1), pp. 173-184. DOI: [10.13031/2013.17142](https://doi.org/10.13031/2013.17142)
- [51] MYCIELSKA, M. y DJAMGOZ, M. 2004. *Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease*. *Journal of Cell Science*, **17**, pp. 1631-1639. DOI: [10.1242/jcs](https://doi.org/10.1242/jcs).
- [52] FALLAH, H.; FALLAH, A. y ALI, M. 2011. *Photoactive polyacrylonitrile fibers coated by nano-sized titanium dioxide: synthesis, characterization, thermal investigation*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **56**(1), pp. 610-615. DOI: [10.4067/S0717-97072011000100020](https://doi.org/10.4067/S0717-97072011000100020)
- [53] REYERO, J. 2017. *Membranas de Poliacrilonitrilo funcionalizadas con Óxido de Grafeno para su aplicación en la regeneración de tejido neuronal*. Diban, N.; Sánchez, S. (dirs.). Trabajo Fin de Grado. Disponible en UCrea: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/12132>
- [54] DE LA HOZ, R. 2019. *Membranas composites PCL/grafeno: estudio del efecto del grado de oxidación en los nanomateriales de grafeno sobre el control molecular de la*

*diferenciación celular*. Diban, N.; Tapia; O. (dir.). Trabajo Fin de Grado. Universidad de Cantabria. Disponible en UCrea: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/15728>

[55] KANAGA, M. et al. 2009. *Plant genotypic diversity and environmental stress interact to negatively affect arthropod community diversity*. *Arthropod-Plant Interactions*, **3**, pp. 249-258. DOI: 10.1007/s11829-009-9073-8

[56] FRIXEN, U. et al. 1991. *E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells*. *Journal of Cell Biology*, **113**, pp. 173-185. DOI: [10.1083/jcb.113.1.173](https://doi.org/10.1083/jcb.113.1.173)