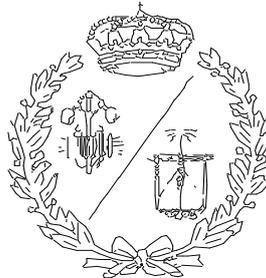


ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Carrera

**CARACTERIZACIÓN DE LAS
PROPIEDADES DE TRANSPORTE DE
MEMBRANAS BIODEGRADABLES DE POLI-
 ϵ -CAPROLACTONA EN INGENIERÍA
TISULAR**

(Characterization of the transport properties
of biodegradable poly- ϵ -caprolactone
membranes for tissue engineering)

Para acceder al Título de

INGENIERO QUIMICO

Autor: Beatriz Gómez Ruiz

Septiembre - 2014

ÍNDICE

1. PLANTEAMIENTO	12
1.1 Ingeniería de tejidos	12
1.2 Soportes o <i>Scaffolds</i>	16
1.2.1 Propiedades de transporte de nutrientes en los scaffold	18
1.2.2 Adsorción de proteínas	22
1.3 Objetivos	24
2. DESARROLLO	26
2.1 Metodología experimental	26
2.1.1 Fabricación de membranas poliméricas por inversión de fases..	26
2.1.2 Caracterizaciones físicas	29
2.1.3 Caracterización de propiedades de transporte	35
2.1.4 Adsorción de proteínas	40
2.1.5 Viabilidad del cultivo celular	41
2.1.6 Tratamiento estadístico de los resultados.....	44
2.2 Resultados y discusión.....	44
2.2.1 Caracterización física.....	44
2.2.2 Caracterización de propiedades de transporte	51
2.2.3 Adsorción de proteínas (BSA).....	72
2.2.4 Viabilidad del cultivo celular	75
3. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	80
4. BIBLIOGRAFÍA	83
5. ANEXOS	90
ANEXO I. Nomenclatura del proyecto	90
ANEXO II. Composición medio de cultivo 'Advanced DMEM'.....	91
ANEXO III. Resultados Porometría de flujo capilar	92
ANEXO IV. Experimentos de caracterización de flujo de agua	94

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1.1 Concepto básico de ingeniería de tejidos [1].	13
Figura 1.2 Tipos de biorreactores en ingeniería de tejidos (a) estáticos y (b) dinámicos [8].	15
Figura 1.3 Tres aspectos básicos en el diseño de un scaffold [1].	16
Figura 2.1 Sistema experimental empleado para la preparación de la disolución de PCL al 15% w/w en NMP (agitador, manta calefactora y termopar).	26
Figura 2.2 Filtro de malla metálica, kitasato y bomba de vacío.	27
Figura 2.3 Disolución de PCL al 15% w/w en NMP ya filtrada y lista para desgasificar.	27
Figura 2.4 Membrana de PCL durante su precipitación dentro del primer baño de coagulación.	28
Figura 2.5 Masa de queroseno para los distintos volúmenes de queroseno, obteniendo como pendiente la densidad en (g/cm^3)	30
Figura 2.6 Coulter Porometer II.	32
Figura 2.7 Medida del ángulo de contacto	33
Figura 2.8 Mecanismos de filtración [23].	35
Figura 2.9 Sistema experimental de flujo lineal.	36
Figura 2.10 Sistema experimental Flujo tangencial.	36
Figura 2.11 Absorbancia para las distintas concentraciones de disoluciones de BSA en agua UP	39
Figura 2.12 Absorbancia para las distintas concentraciones de disoluciones de BSA en en SDS al 1% en volumen	41
Figura 2.13 Imagen de la vista superior de los dos tipos soportes de cultivo celular en estático.	42
Figura 2.14 Imágenes de SEM de superficie y sección trasnversal para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA.	46

Figura 2.15 A: Flujo a través de la membrana aplicando presión de aire. B: Distribución del tamaño de poro para la membrana de PCL/EtOH.....	48
Figura 2.16 A: Flujo a través de la membrana aplicando presión de aire. B: Distribución del tamaño de poro para la membrana de PCL/IPA.....	49
Figura 2.17 Imágenes del ángulo de contacto para las membranas PCL/EtOH y PCL/IPA. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 7$	50
Figura 2.18 Valores de flujo promedio de agua UP a distintas presiones transmembranales, durante el ensayo de ciclo de subida y bajada de presión, a través de membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal.....	52
Figura 2.19 A: Flujo de agua ultrapura a distintas presiones transmembranales a lo largo del tiempo. B: Flujo de agua ultrapura promedio para cada presión. Para la membrana PCL/EtOH para los distintos ciclos de subida y bajada, en el sistema de Flujo tangencial.....	53
Figura 2.20 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal.	54
Figura 2.21 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal.	55
Figura 2.22 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial. ...	55
Figura 2.23 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial.	56
Figura 2.24 Flujo (A y B) y permeancia (C y D) de agua UP en el estado estacionario, para las membranas PCL/EtOH, en rojo, y PCL/IPA, en azul, para los dos tipos de sistemas de configuración de flujo. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, y entre los dos sistemas experimentales para cada tipo de membrana, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$	57
Figura 2.25 Factor de compactación de la membrana PCL/EtOH y PCL/IPA, cada sistema de configuración de flujo.....	59
Figura 2.26 Evaluación de flujo de agua UP a lo largo del tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal.....	60

Figura 2.27 Evolución del flujo adimensional total con el tiempo, para la membrana PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal.....	62
Figura 2.28 Evolución del flujo adimensional total con el tiempo, para la membrana PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial.....	62
Figura 2.29 Permeabilidad total (A), permeabilidad de BSA (B), y Rechazo (C) en el estado estacionario, de las membranas PCL/EtOH y PCL/IPA, para cada sistema de configuración de flujo.	64
Figura 2.30 Imágenes de membranas PCL/EtOH y PCL/IPA tras la filtración de BSA en flujo lineal.....	67
Figura 2.31 Evolución del ángulo de contacto con el tiempo, para las membranas PCL/EtOH (A) y PCL/IPA (B).	69
Figura 2.32 Valores del ángulo de contacto al finalizar el experimento. * Diferencias significativas entre el ángulo de contacto de muestras nuevas con las muestras de filtración de BSA analizado para cada membrana, PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 3$	70
Figura 2.33 Medida del ángulo de contacto para tres tipos de scaffold: albumin, PCL-, PCL+ [31].	71
Figura 2.34 Cantidad de BSA adsorbida en las membranas PCL/IPA y PCL/EtOH.	73
Figura 2.36 Imágenes de confocal tridimensionales (A y C) y superficiales (B y D) para el cultivo celular de glioblastoma humano tras 48 h. Las imágenes A y B corresponden a PCL/EtOH, y C y D, a PCL/IPA. Todos los núcleos se representan en azul, y la arquitectura del citoesqueleto de actina, en verde. Magnificación original x200. Las barras indican 50 μm	75
Figura 2.37 Imágenes de SEM de la adhesión y crecimiento de células neuronales en el soporte de PCL/EtOH (A, C y D) y en de PCL/IPA (B, E y F) tras 48 h de cultivo celular. La barra de escala para A y B es de 200 μm , y para C, D, E y F, es de 20 μm . G y H representan imágenes de control de morfología y adhesión celular de glioblastoma U87 tras 48 h en matraz de plástico (barra de escala de G 50 μm , y de H, 20 μm).....	76
Figura 2.38 Imágenes de confocal del cultivo celular de glioblastoma humano tras 48h con marcador Mito Tracker para la evaluación de la viabilidad mitocondrial. Los núcleos se representan en azul, la arquitectura del citoesqueleto de actina, en verde, y las mitocondrias en rojo. Las	

imágenes A y B corresponden a PCL/EtOH, y la imagen C a PCL/IPA. El círculo rojo muestra células durante la división. Barra de escala es de 10 μm	78
Figura 5.1 Distribución de tamaño de poro a lo largo de WET RUN y DRY RUN, para todas las muestras de la membrana PCL/EtOH, mediante porometría de flujo capilar	92
Figura 5.2 Distribución de tamaño de poro a lo largo de WET RUN y DRY RUN, para todas las muestras de la membrana PCL/IPA, mediante porometría de flujo capilar	93
Figura 5.3 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal.....	94
Figura 5.4 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal ...	94
Figura 5.5 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal.....	95
Figura 5.6 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal.....	95
Figura 5.7 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal	96
Figura 5.8 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial.....	96
Figura 5.9 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial.....	97
Figura 5.10 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial.....	97
Figura 5.11 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial.....	98

Figura 5.12 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial	98
Figura 5.13 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial	99
Figura 5.14 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal	100
Figura 5.15 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal	100
Figura 5.16 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal	101
Figura 5.17 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal	101
Figura 5.18 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal	102
Figura 5.19 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal	102
Figura 5.20 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal	103
Figura 5.21 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal	103
Figura 5.22 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial	104
Figura 5.23 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial	104
Figura 5.24 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial	105
Figura 5.25 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial	105
Figura 5.26 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial	106
Figura 5.27 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial	106

Figura 5.28 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial	107
Figura 5.29 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial	107

Tablas

Tabla 1.1 Materiales empleados en aplicaciones de IT ([1]).....	18
Tabla 1.2 Proporción de los nutrientes en el medio de cultivo.....	20
Tabla 2.1 Espesor, porosidad mediante queroseno, y porosidad mediante iso-propanol, para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$	44
Tabla 2.2 Tamaño medio de poro a partir de la porometría de flujo capilar, para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 7$	50
Tabla 2.3 Comparativa de los valores de flujo y permeancia de agua en el estado estacionario, entre el primer experimento y su repetición, para el sistema de flujo lineal. * Diferencias significativas entre la primera medida de flujo y su repetición, para PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$	60
Tabla 2.4 Comparativa de los valores de flujo y permeancia de agua en el estado estacionario, entre el primer experimento y su repetición, para el sistema de flujo lineal. * Diferencias significativas entre la primera medida de flujo y su repetición, para PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$	61
Tabla 2.5 Valores de permeancia de agua (K_w), permeancia total (K_T) y de bsa (k_{BSA}), y rechazo (R), en el sistema de flujo lineal, para una presión constante de 0,3 bar.	65
Tabla 2.6 Valores de permeancia de agua (K_w), permeancia total (K_T) y de bsa (k_{BSA}), y rechazo (R), en el sistema de flujo tangencial, para una presión constante de 0,2 bar.	65

Tabla 2.7 Comparativa de adsorción de BSA con otros trabajos, para distintas membranas poliméricas, tanto de PCL, como otros materiales poliméricos.....	74
Tabla 5.1 Valores de diámetro mínimo, máximo y medio (d_p) obtenido a para todas las muestras de PCL/IPA mediante porometría de flujo capilar	92
Tabla 5.2 Valores de diámetro mínimo, máximo y medio (d_p) obtenido a para todas las muestras de PCL/IPA mediante porometría de flujo capilar	93
Tabla 5.3 Condiciones experimentales del experimento 1.....	94
Tabla 5.4 Condiciones experimentales del experimento 2.....	94
Tabla 5.5 Condiciones experimentales del experimento 3.....	95
Tabla 5.6 Condiciones experimentales del experimento 4.....	95
Tabla 5.7 Condiciones experimentales del experimento 5.....	96
Tabla 5.8 Condiciones experimentales del experimento 6.....	96
Tabla 5.9 Condiciones experimentales del experimento 7.....	97
Tabla 5.10 Condiciones experimentales del experimento 8.....	97
Tabla 5.11 Condiciones experimentales del experimento 9.....	98
Tabla 5.12 Condiciones experimentales del experimento 10.....	98
Tabla 5.13 Condiciones experimentales del experimento 11.....	99
Tabla 5.14 Condiciones experimentales del experimento 1.....	100
Tabla 5.15 Condiciones experimentales del experimento 2.....	101
Tabla 5.16 Condiciones experimentales del experimento 3.....	102
Tabla 5.17 Condiciones experimentales del experimento 4.....	103
Tabla 5.18 Condiciones experimentales del experimento 5.....	104
Tabla 5.19 Condiciones experimentales del experimento 6.....	105
Tabla 5.20 Condiciones experimentales del experimento 7.....	106
Tabla 5.21 Condiciones experimentales del experimento 8.....	107

1. PLANTEAMIENTO

1. PLANTEAMIENTO

1.1 Ingeniería de tejidos

El trasplante de órganos directo presenta muchas dificultades, debido a la insuficiencia de donantes de órganos, transmisión de patógenos y la posibilidad de rechazo del órgano del donante. Un trasplante de ingeniería de tejidos autógeno (utilizando las propias células del paciente) haría frente a la mayoría de las limitaciones y dificultades del trasplante directo. Por lo tanto, la construcción de un nuevo tejido *in vitro* se considera una excelente alternativa al trasplante de órganos de donantes [1,2].

El término “ingeniería de tejidos” nació, hace alrededor de 30 años, para representar un nuevo concepto que se centra en la regeneración de nuevos tejidos, a partir de células, con el apoyo de biomateriales y factores de crecimiento [3].

La ingeniería de tejidos (IT) se define como un campo multidisciplinar que aplica los principios y métodos de la ingeniería y ciencias de la vida, con el fin de entender y desarrollar sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos [1].

Para optimizar el desarrollo de sustitutos biológicos funcionales, la IT intenta imitar la función del tejido natural. Para ello, se necesita conocer exhaustivamente las condiciones naturales del tejido específico. Las células son el núcleo del tejido, sin embargo, no puede funcionar en ausencia de sistemas de señalización y/o de la matriz extracelular (MEC). El sistema de señalización consta de genes que segregan productos de transcripción cuando son activados diferencialmente, e instan a las señales formación y diferenciación de los tejidos. La MEC es un medio en forma de malla, que soporta la unión celular y promueve la proliferación celular [1].

Existen tres estrategias terapéuticas en IT para el tratamiento de tejidos dañados o enfermedades en pacientes [4]:

- *Implantación de células aisladas o cultivadas* (procedentes del donante o del paciente) directamente sobre el tejido dañado o con ayuda de scaffold o soporte biodegradable, donde estas células crecerán y se diferenciarán.
- *Implantación de tejido procedente de células y soporte o scaffold*, cuando ha crecido y desarrollado por completo (Figura 1.1).
- *Regeneración tisular (in situ)*. Un scaffold se implanta en la zona del tejido dañado, para promover el crecimiento celular en esa zona.

Este proyecto se desarrollará en el concepto de IT representado en la figura 1.1. Esta estrategia consiste en la extracción de una pequeña biopsia de tejido autólogo, del cual se aislarán células para ser expandidas *in vitro*. Tras esto, estas células se depositan en un scaffold o soporte, necesario para su proliferación, y así se dará la formación del tejido. Finalmente, se procede a la implantación del tejido *in vivo*.

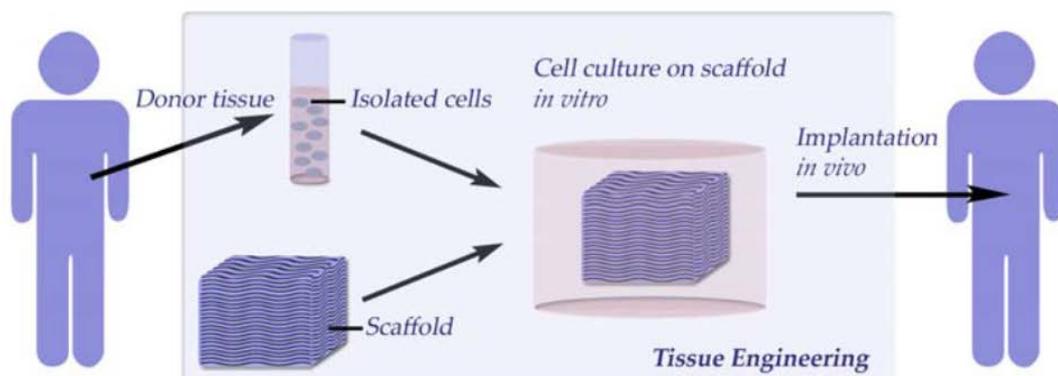


Figura 1.1 Concepto básico de ingeniería de tejidos [1].

El éxito para la producción de tejidos con fines terapéuticos requiere una fuente adecuada de células, que sean capaces de extenderse, una optimización de los soportes o *scaffold* y creación del biorreactor [4].

El término “biorreactor” hace referencia a un sistema en el que las condiciones están estrictamente controladas para permitir el crecimiento de células y tejidos o inducir cierto comportamiento sobre el tejido en desarrollo.

El objetivo general de un biorreactor en IT, es formar y almacenar, de forma segura y reproducible, tejidos funcionales 3D que puedan llevar a cabo su función *in vivo*. Para ello el biorreactor debe cumplir las siguientes funciones: (1) mantener concentraciones uniformes de células deseadas dentro del soporte o scaffold durante el cultivo celular, (2) controlar los parámetros medioambientales (temperatura, pH, presión, tensión de oxígeno, metabolitos, moléculas, reguladores, tensión cortante y estímulos eléctricos) y parámetros asepticos (alimentación, eliminación de desechos, muestreo), (3) facilitar la transferencia de masa, y finalmente, (4) permitir etapas de proceso automatizadas [5,6].

Por otro lado, dentro del cultivo en el biorreactor se pueden generar estímulos mecánicos, tales como, compresión mecánica, presión hidrodinámica o flujo de fluido, que pueden generar un impacto positivo sobre la formación del tejido, mejorando las propiedades de este [6,7].

Los tipos de biorreactores para IT, generalmente, se dividen en (a) estáticos y (b) dinámicos. Además, existen sub-divisiones en función de la geometría y funciones especiales que requiera el tejido, como se puede observar en la figura 1.2. Estos biorreactores ofrecen tres tipos de condiciones de flujo: estático, laminar y turbulento. Esto hace que existan diferentes velocidades de suministro de nutrientes y tensiones cortantes sobre el cultivo celular [6]. A continuación, se detallan las características de cada tipo de biorreactor.

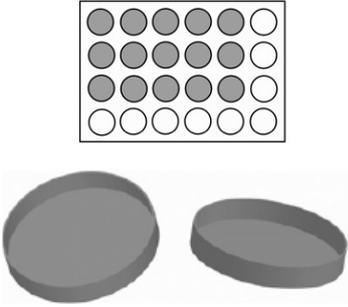
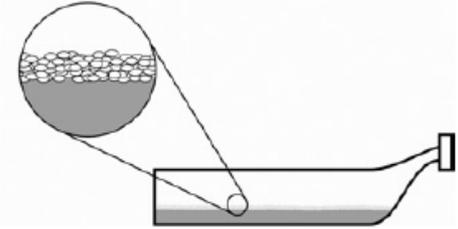
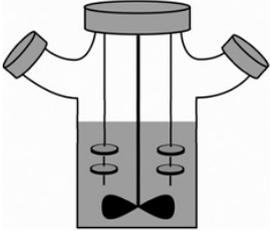
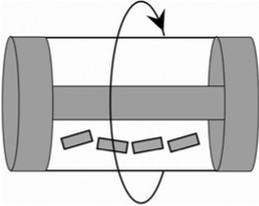
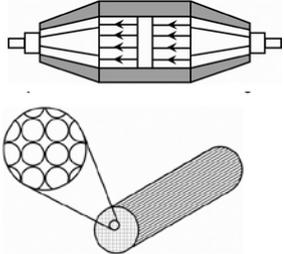
(a) BIORREACTORES ESTÁTICOS		
(1) Discos planos	(2) Matraz estático	
		
(b) BIORREACTORES DINÁMICOS		
(3) Matraz de agitación	(4) Biorreactor con rotación de pared	(5) Biorreactor de perfusión y de fibra hueca
		

Figura 1.2 Tipos de biorreactores en ingeniería de tejidos (a) estáticos y (b) dinámicos [8].

Sin embargo, para el desarrollo celular en estos dispositivos son necesarios scaffolds o soportes, en donde, se depositaran las células para su proliferación y diferenciación.

1.2 Soportes o Scaffolds

Dado el gran desarrollo de la ingeniería de tejidos, numerosos grupos de investigación se han centrado en la fabricación de estructuras que soportan las células, dado que, la mayor parte de tejidos y órganos, requerirán un soporte para su formación. Se trata de una estructura 3D, también llamado scaffold, que mantiene a las células aisladas convertirse en un nuevo tejido antes de ser trasplantado al paciente [3].

La función de estos soportes, es similar a la matriz extracelular, debe permitir y favorecer la síntesis, unión, proliferación y diferenciación celular. El diseño de este soporte determina la funcionalidad del tejido requerido. Los aspectos de diseño de un scaffold se dividen en tres clases:

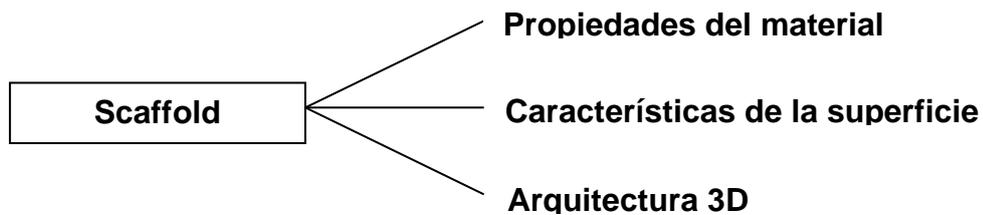


Figura 1.3 Tres aspectos básicos en el diseño de un scaffold [1].

Las características del scaffold deben ser las siguientes [1]:

- *Biocompatible*: el soporte debe provocar una respuesta biológica adecuada y prevenir cualquier respuesta adversa del tejido.
- *Biodegradable*: los materiales deben ser capaces de degradarse con la regeneración del tejido y remodelar la matriz extracelular (ECM) en sustancias no tóxicas que no interfiera con el tejido construido.
- *Promover la unión, difusión y proliferación de células*; necesario para la regulación del crecimiento celular y la diferenciación.
- *Resistencia mecánica adecuada*, similar a la del tejido in-vivo, en el lugar de implantación.

- *Buenas propiedades de transporte*, para asegurar el transporte de nutrientes hacia las células y eliminación de los productos de desecho. Para ello, el soporte debe tener alta porosidad, buena conectividad entre poros y mantener suficiente resistencia mecánica.
- *Facilidad de conexión al sistema de vascularización del paciente*, así garantizar un buen suministro de nutrientes en el soporte tras la implantación.
- *Características adecuadas de la superficie*: además de las propiedades físico-química óptimas.

Los materiales para la fabricación de estos soportes, se pueden clasificar en función de las propiedades mecánicas requeridas en las distintas aplicaciones de la ingeniería de tejidos. De esta forma, existen dos grupos, aplicaciones “blandas o suaves”, como músculo esquelético o tejido cardiovascular; o aplicaciones “duras”, como el tejido óseo [1]. Los distintos materiales se encuentran recogidos en la tabla 1.1.

Se puede observar como las aplicaciones “blandas o suaves” pueden emplear amplia variedad de polímeros y las “duras”, se basan en polímeros rígidos, material cerámico o metal [1].

Tabla 1.1 Materiales empleados en aplicaciones de IT [1].

APLICACIONES “DURAS” DE IT	
MATERIAL	TIPO
Cerámicas cristalinas	Hidroxiapatita <i>el más común, ya que es un componente ingorgánico de los huesos</i> Fosfato tricálcico Metafosfato de calcio
Vidrios amorfos	Sílice <i>Bioglass</i>
Materiales compuestos	Hidroxiapatita / Poli(ϵ -caprolactona), quitosano, y/o colágeno Fosfato de calcio / titanio, alcohol polivinílico y/o boro Ácido poliláctico / Fosfato tricálcico, sílice y/o cerámica
Metales	Acero inoxidable Titanio Aluminio
APLICACIONES “BLANDAS” DE IT	
ORIGEN	POLÍMERO (FAMILIA)
Natural	Colágeno <i>componente de la matriz extracelular – ECM</i> Fibrina Gelatina Poli(hidroxibutirato) Polisacáridos <i>los más comunes son el ácido hialurónico, quitosano, almidón y alginatos</i>
Sintético	Poliésteres <i>los más comunes son los poli(α-hidroxiácidos): ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA)</i> Poli(ϵ -caprolactonas) Poli(fumaratos de propileno) Poli(anhídridos) Poli(ortoésteres)

1.2.1 Propiedades de transporte de nutrientes en los scaffold

Una de las propiedades de los scaffolds, es que deben facilitar también el aporte o suministro de nutrientes a las células.

En el sistema de cultivo, es necesario proporcionar una distribución uniforme de nutrientes para poder obtener un crecimiento homogéneo de células, y por tanto, del tejido. El suministro de nutrientes puede realizarse por difusión pasiva o de forma activa mediante perfusión directa, aunque esta forma introduce un nivel más de complejidad en cuanto al diseño del sistema [5,6].

Existen diferentes medios de cultivo, adaptados nutricionalmente a los requerimientos de las células o tejido que se desea desarrollar.

En cualquier medio de cultivo deben existir los siguientes nutrientes [9]:

- *Aminoácidos.* Es necesario suplementar el medio basal con aminoácidos esenciales. El suplemento más común es glutamina, y en otras ocasiones, glutamato.
- *Vitáminas.* La limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento. El medio MEM solo suplementa las vitaminas del grupo B, siendo los demás grupos aportados por el suplemento de suero. En medios más definidos se suplementan todas las vitaminas.
- *Glucosa.* Es la fuente de energía principal en muchos medios. Forma parte de la mayoría de los ciclos metabólicos, generando en ocasiones CO₂ como residuo.
- *Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular.* Dependiendo del medio, éste incluye en su formulación nucleósidos, intermediarios del ciclo de Krebs, piruvato, lípidos...
- *Hormonas y factores de crecimiento.* En los medios no definidos suele aportarlos el suero.
- *Proteínas.* Son moléculas indispensables en el cultivo celular, ya que presentan funciones, tales como: transporte de numerosas sustancias (aminoácidos, ácidos grasos, enzimas, hormonas y productos

tóxicos); control del equilibrio de líquidos entre los compartimentos intravascular y extravascular del organismo; respuesta inflamatoria y control de la infección. Además, los factores de crecimiento, también son proteínas, que estimulan el crecimiento, diferenciación y maduración celular, y juegan un papel importante en el proceso de formación de tejidos. Bovine Serum Albumin (BSA) es la proteína más abundante tanto en el torrente sanguíneo, como en los medios de cultivo. No es posible el desarrollo un sistema de cultivo en ausencia de BSA, dado que, que no se produce el crecimiento celular [10].

En la tabla 1.2 se observa la proporción de los distintos grupos de nutrientes en el medio de cultivo, comparando tres medios distintos: MEM, DMEM, F12. Dentro de 'otros componentes' se encuentran compuestos, tales como, glucosa, etanolamina, piruvato sódico, etc.

Tabla 1.2 Proporción de los nutrientes en el medio de cultivo.

	Proporción en el medio MEM (%)	Proporción en el medio DMEM (%)	Proporción en el medio F12 (%)
AMINOACIDOS	5.46	6.44	5.12
VITAMINAS	0.09	0.20	0.25
SALES INORGANICAS	81.66	63.86	69.25
PROTEINAS	3.47	2.44	2.87
ELEMENTOS TRAZA	5.48E-05	3.86E-05	3.68E-05
OTROS COMPONENTES	9.32	27.06	22.51

Se puede observar como la proporción de los distintos grupos de nutrientes, es similar de un medio de cultivo a otro. Sin embargo, sí existe diferencia entre las cantidades de los compuestos específicos dentro de cada grupo de nutrientes.

La distribución de nutrientes *in-vivo* se consigue a través de una amplia red de capilares y vasos sanguíneos que llegan hasta los tejidos, que dan como

resultado una difusión máxima hasta una distancia de 200 μm . En el caso del desarrollo del tejido *in-vitro*, la distancia con la fuente principal de nutrientes excede en su mayoría de las 200 μm , esto reduciéndose el suministro de nutrientes a la zona más lejana de la fuente, produciéndose gradientes en el suministro de nutrientes. Esto conduce a la variación del comportamiento celular y una distribución no homogénea de células y de matriz extracelular a través del tejido desarrollado [1]. Por lo tanto, la transferencia de nutrientes o la eliminación de metabolitos, es considerado uno de los mayores retos en el diseño de un scaffold.

En los sistemas de cultivo, los nutrientes y el oxígeno, deben ser transportadas eficientemente desde el seno del medio de cultivo hasta la superficie del tejido, denominado transferencia de materia externa; y también desde esta superficie hasta el interior de las células del tejido, denominado transferencia de materia interna. Además, los metabolitos y el dióxido de carbono deben ser eliminados desde las células hasta el seno del medio de cultivo. La transferencia de materia externa depende de las condiciones hidrodinámicas del biorreactor, y la transferencia interna, está fuertemente relacionado con la porosidad y la estructura del scaffold [6].

Dada la limitación de nutrientes en los sistema de cultivo *in-vitro*, se han desarrollado diferentes estudios para intentar abordar esta problemática. Varios grupos han estudiado el diseño de scaffold con poros de gran tamaño, y favorecer así, el transporte de nutrientes [11]. Avances más recientes, tratan de crear sistemas con canales o conductos de transporte, en forma de redes bifurcadas. Por ejemplo, Kang et al [12] establece el procedimiento para el diseño de un sistema de red eficaz para un cultivo celular, simulando la red biológica vascular, fabricando scaffolds porosos que contienen la red de conductos de transporte incrustada.

Además, los nutrientes del medio de cultivo presentan tamaños moleculares entre 50-500 Da, exceptuando las proteínas, ya que estas poseen pesos moleculares dos órdenes de magnitud mayor, en un rango de 5.000-80.000 Da. A pesar de que el tamaño de poro de los scaffold utilizados en ingeniería

de tejidos, generalmente, es mucho mayor que el tamaño de molécula de las proteínas, estas pueden quedarse atrapadas en la membrana.

Numerosos estudios han descubierto ensuciamiento o fenómenos de fouling en membranas poliméricas, al estar en contacto con disoluciones de proteínas. Los mecanismos de fouling que se pueden originar, generalmente, se dividen en dos tipos: (1) fouling externo, ocasionado por depósitos de proteína sobre la superficie de membrana y (2) fouling interno, debido a la adsorción sobre la superficie de los poros [13].

El fouling externo, se produce por la deposición de agregados de proteínas [14]. Kelly y Zydney [15], demuestran que los agregados de la proteína BSA, ocurre por la formación de enlaces disulfido entre moléculas de BSA. Por otro lado, el fouling interno se produce por las interacciones entre las proteínas y la superficie del poro. Estas interacciones están gobernadas por fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas [13].

1.2.2 Adsorción de proteínas

La biocompatibilidad de los materiales con la sangre (*in-vivo*) está relacionado con evitar fenómenos como: toxicidad celular, inflamaciones o riesgos de trombosis por oclusión aguda de los vasos [16]. Sin embargo, la formación de trombos, ocasionada por coagulación de la sangre, está relacionada con el cambio de conformación de las proteínas del plasma tras ser adsorbidas en la superficie de materiales. Por lo tanto, los fenómenos de adsorción de proteínas deben ser estudiados, como primer paso, para analizar la biocompatibilidad de los materiales con la sangre [16]. Por otro lado, otros grupos de investigación han demostrado que en los sistemas de cultivo *in-vitro*, la carga de proteína sobre la base polimérica del scaffold, puede mejorar la unión celular, y en el caso de factores de crecimiento, la osteoinducción [17]. Por lo tanto, se debe estudiar y evaluar la adsorción de proteínas para cada situación específica.

La mayor dificultad es distinguir la proteína adsorbida en la superficie del poro, de la adsorbida en la superficie de membranas. El método de adsorción estática, que consiste en sumergir una muestra de membrana en disolución de proteína, se utiliza para caracterizar el efecto de adsorción de proteínas, mientras que en los métodos dinámicos por filtración de disolución, la adsorción puede verse afectada por el flujo convectivo en el poro [18].

Existen una serie de factores que influyen sobre la adsorción de proteínas en membranas: morfología, hidrofilidad / hidrofobicidad y condiciones de operación.

- Morfología de membrana

La cantidad de proteína adsorbida dependerá del tamaño de poro. Así, en las membranas de ultrafiltración la cantidad de proteína adsorbida dentro de los poros es más pequeña en comparación con la adsorbida en la superficie. Sin embargo, en el caso de membranas de microfiltración, hay mayor adsorción dentro de los poros. Además, numerosos estudios muestran que el fenómeno de fouling en la membrana será más relevante a medida que el diámetro de poro es mayor [19].

- Hidrofilidad / hidrofobicidad

Uno de los mayores factores que mejora la adsorción de proteínas es la interacción hidrofóbica entre la superficie de la membrana y las proteínas. Por lo tanto, la adsorción máxima se alcanza en membranas hidrofóbicas, y la adsorción mínima en membranas hidrofílicas [19].

- Condiciones de operación

Generalmente, la máxima adsorción se produce es obtenida para un pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína [18].

1.3 Objetivos

El presente Trabajo Fin de Carrera se ha llevado a cabo en el grupo de investigación Tecnologías Ambientales y Bioprocesos, del Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular de la Universidad de Cantabria. El TFC se ha realizado en el marco de una Beca de Colaboración asignada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, cuyo objetivo ha sido la iniciación en tareas de investigación.

El objetivo general de este proyecto consiste en estudiar las propiedades de transporte de nutrientes en membranas biodegradables y biocompatibles, elaboradas a partir de poli- ϵ -caprolactona (PCL). Con ello, se comprobará la viabilidad para su potencial aplicación como soporte de crecimiento celular del sistema nervioso central.

Para ello, se fabricarán dos tipos de membranas planas a través de la técnica de inversión de fases (utilizando dos tipos de baños de coagulación: etanol e iso-propanol). Los ensayos de caracterización utilizados consistirán en el análisis de flujo de agua y de proteína modelo Bovine Serum Albumin (BSA) en dos sistemas configuración de flujo: flujo lineal y flujo tangencial

2. DESARROLLO

2. DESARROLLO

2.1 Metodología experimental

2.1.1 Fabricación de membranas poliméricas por inversión de fases

Para la elaboración de estas membranas, se preparó una disolución polimérica al 15% en peso de poli- ϵ -caprolactona (PCL, Peso molecular 80000 Da, Sigma-Aldrich) empleando N-metilpirrolidona (NMP, 99%, extra pure, Acros Organic) como disolvente. Se agitó durante 24 h, para una completa disolución y homogeneización de la PCL, mediante un agitador mecánico de rotación vertical (MRVS-08, SBS). Para facilitar la disolución de la PCL en el disolvente, se calienta la disolución a partir de una manta calefactora (Fibroman-N, J.P. Selecta), hasta que la mezcla alcanza los 35 °C. Se usa un termopar (P. Selecta) para control de la temperatura. En la figura 2.1 se observa el sistema para llevar a cabo la disolución polimérica.



Figura 2.1 Sistema experimental empleado para la preparación de la disolución de PCL al 15% w/w en NMP (agitador, manta calefactora y termopar).

Una vez preparada la disolución, se realizó la filtración de la misma, mediante un filtro de malla metálica con diámetro de poro de 25 μ m, figura

2.2, para eliminar posibles restos de polímero sin disolver o partículas, con el fin de evitar imperfecciones en las membranas a fabricar posteriormente.



Figura 2.2 Filtro de malla metálica, kitsato y bomba de vacío.

Tras el filtrado, se dejó la disolución en un matraz de vidrio (Figura 2.3) tapado herméticamente (evitando así la evaporación del disolvente), para la desgasificación, durante 24 h.



Figura 2.3 Disolución de PCL al 15% w/w en NMP ya filtrada y lista para desgasificar.

Tras la comprobación de que la disolución se encuentra libre de burbujas, se realizaron las membranas planas de PCL. Para ello se vertió una pequeña cantidad de la disolución en un vidrio con superficie sin defectos, y con ayuda de un cuchillo o *casting knife* se extiende la disolución a lo largo del vidrio. El cuchillo se ajustó previamente a una altura de 200 μm .

Inmediatamente después de extender la disolución, se introdujo el vidrio con la disolución en el baño de coagulación.

Se utilizaron dos tipos de baños de coagulación: etanol (EtOH, technical, Acros Organics) e iso-propanol (IPA, 99,9%, Oppac), para el estudio posterior de su influencia sobre las propiedades de transporte de materia de la membrana.

Las membranas obtenidas se codificaron en función del disolvente empleado en la fabricación, como: PCL/EtOH y PCL/IPA, utilizando el disolvente EtOH e IPA, respectivamente.

La disolución fue precipitando dentro del baño de coagulación (Figura 2.4), produciéndose así la separación instantánea entre la membrana y el soporte de vidrio. Tras eso, la membrana se traslada al segundo baño de coagulación, que tiene la misma composición que el primero. Se deja en este baño 24 h para asegurar la coagulación completa del polímero.



Figura 2.4 Membrana de PCL durante su precipitación dentro del primer baño de coagulación.

Las membranas ya coaguladas se introdujeron en agua ultrapura (UP) durante 48 h, cambiando el agua 3 veces al día para asegurar la eliminación de restos de disolvente de la matriz polimérica. Este paso es fundamental,

dado que, restos de disolvente pueden ocasionar la muerte celular en los sistemas de cultivo.

Finalmente, las membranas se introdujeron en una disolución al 25% v/v de glicerina/agua durante 24 h y se dejaron secar durante otras 24 h en condiciones ambientales. La disolución de glicerina ayuda a preservar la estructura de las membranas, para el secado y almacenamiento hasta la caracterización de las mismas.

La fabricación y caracterización física y estructural de membranas poliméricas se realizó para la comprobación de reproducibilidad de las membranas ya realizadas en anteriores trabajos [20,21], y para continuar con el análisis y caracterización de las propiedades de transporte de nutrientes en las mismas, objetivo del presente trabajo.

2.1.2 Caracterizaciones físicas

❖ Espesor de la membrana

El espesor de la membrana (δ) se midió mediante un micrómetro electrónico (Modelo Standard, Serie 293, Mitutoyo).

❖ Porosidad

La porosidad de membrana (ε) se puede definir como la fracción de huecos, esto es, el volumen de poros dividido entre el volumen total de membrana. La determinación de la porosidad se realizó mediante el método gravimétrico descrito por Alsahy et al [22]. Para ello, se realizó un lavado de las muestras mediante filtración de agua ultrapura durante aproximadamente 30 minutos, y eliminar así el preservante que contienen. Tras esto, se introdujeron en el horno a vacío (Vaciotem-T, P-Selecta) durante 24 h, a 30° y 200 mbar. Una vez secas, se pesaron las muestras en balanza de precisión (AT21 Comparator, Mettler Toledo) y se sumergieron en el disolvente, durante otras 24 h. Se utilizaron dos disolventes distintos, queroseno e isopropanol. Se realizó de nuevo la pesada de las muestras, secando completamente la

superficie de las mismas antes de pesar. La porosidad, finalmente, se calculó según la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.1.**

$$\varepsilon_d(\%) = \frac{(W_1 - W_2)/\rho_d}{[(W_1 - W_2)/\rho_d + W_2/\rho_p]} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Siendo ε_d la porosidad media obtenida, donde el subíndice 'd' representa el disolvente, que puede ser, queroseno 'k' o iso-propanol 'i'. W_1 representa el peso de la membrana húmeda (g) y W_2 el peso de la membrana seca (g). ρ_d hace referencia a la densidad del disolvente, 0.7935 g/cm³ para el queroseno (medida experimental) o 0.8035 g/cm³ para el iso-propanol (Oppac), y ρ_p la densidad de la PCL (1,145 g/cm³, Sigma Aldrich).

La densidad de queroseno se calculó pesando en balanza de precisión volúmenes conocidos de queroseno. La pendiente de la recta que relaciona masa (ordenadas) con volumen (abscisas), es la densidad del queroseno, tal y como se observa en la figura 2.5.

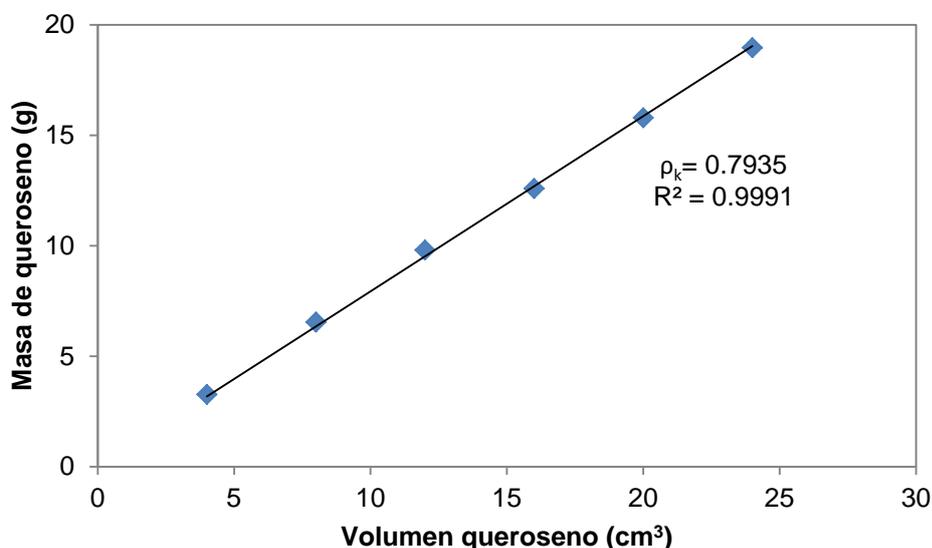


Figura 2.5 Masa de queroseno para los distintos volúmenes de queroseno, obteniendo como pendiente la densidad en (g/cm³)

❖ **Microscopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM)**

La estructura y morfología, de la superficie y sección transversal de las membranas, fue analizada mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM, EVO MA 15, Carl Zeiss) aplicando un voltaje de 12.6 kV.

Para estudiar la sección transversal, las muestras se prepararon y se fracturaron mediante la inmersión en nitrógeno líquido.

Antes de realizar la medida en SEM, las muestras tanto de sección transversal como de superficie, se mantuvieron a 30 °C y 200 mbar durante toda la noche. Para realizar la medida, se recubrieron las muestras con una película delgada de oro, método conocido como “gold sputtering”. Estos experimentos se llevaron a cabo por el Laboratorio de la División de Ciencia e Ingeniería de Materiales (LADICIM) de la Universidad de Cantabria.

❖ **Porometría de flujo capilar**

Esta técnica se llevó a cabo para conocer la distribución de tamaño de poro (GLDP) de las membranas fabricadas.

La porometría de flujo capilar consiste en aplicar presión sobre una muestra porosa, la cual se encontraba previamente mojada. La presión que se aplica para vaciar los poros es inversamente proporcional al tamaño de los poros. Además, también se mide el flujo volumétrico a través de los poros que se vacían. El momento en el cual el poro más grande se vacía, el cual lo hace a las presiones más bajas, se denomina como el “punto del burbuja”. Luego de que todos los poros han sido vaciados en la corrida “húmeda” o *Wet Run* (cuando el sistema alcanza la máxima presión), se ejecuta una segunda corrida “seca” o *Dry Run*.

Para conocer esta distribución de las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA se realizaron recortes de 25 mm de diámetro.

Todas las muestras se analizaron usando Fluorinert como líquido mojante. El Fluorinert (3MTM) ofrece notables características de mojado para todo tipo

de muestras de membranas y posee un valor de tensión interfacial de 16mN/m. Las muestras secas se introdujeron en Fluorinert durante varios minutos, para asegurar que se mojaron totalmente. Tras esto, se introducen las muestras en el porómetro (Coulter Porometer II, Figura 2.6) dentro de una celda de 25 mm. A continuación, se cerró la celda y se aplicó presión de aire seco mediante un compresor, incrementándose la presión paulatinamente.



Figura 2.6 Coulter Porometer II

El equipo divide el rango de medida escogido en 256 puntos (correspondientes a 256 presiones de aire) que se van incrementando lentamente hasta el punto final. Este experimento, denominado *Wet Run* comienza con la muestra mojada, y al final se obtienen la muestra completamente seca. Tras esto, se volvió a recorrer el rango de medida determinando la curva de flujo seco, experimento de *Dry Run*.

Para obtener la distribución del tamaño de poros, se relaciona la presión aplicada con el radio de poro mediante la Ecuación de Washburn (Ecuación 2.2):

$$d = \frac{4 \gamma \cos \theta}{\Delta P} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde d es el diámetro de poro (μm), γ es la tensión interfacial (N m^{-1}) y ΔP la presión transmembranal aplicada (Pa).

A partir de la comparación de las curvas de flujo durante *Wet Run* y *Dry Run*, y mediante la expresión de Washburn, el software determina :

- *Diámetro de poro mínimo (d_{min})*, como valor medio del radio de poro de la distribución de permeabilidades.
- *Diámetro de poro máximo (d_{max})*, como valor medio del radio de poro de la distribución de permeabilidades.
- *Diámetro de poro medio (d_p)*, como valor medio del diámetro de poro de la distribución resultante y corresponde al punto de inflexión de la curva de flujo húmedo (WET RUN).

Esta técnica se llevó a cabo por el grupo de investigación SMAP, Edificio I+D de la Universidad de Valladolid.

❖ **Ángulo de contacto**

Cuando en una superficie plana se coloca una gota de un fluido, esta toma una forma que depende la naturaleza de la superficie y de las fuerzas existentes entre las dos fases. El ángulo formado entre el punto de contacto de la gota y la superficie de la membrana, se denomina ángulo de contacto (θ), (Figura 2.7). La medida del ángulo de contacto resulta útil para el estudio del grado de hidrofilidad / hidrofobicidad. Las superficies hidrófilas muestran valores de ángulo de contacto menor, mientras para las superficies hidrófilas, este valor aumenta [23].

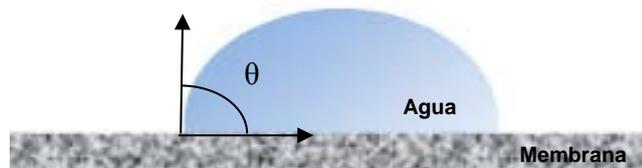


Figura 2.7 Medida del ángulo de contacto

Para la determinación del ángulo de contacto, primero se elimina el preservante con un lavado mediante filtración de agua ultrapura sobre las muestras durante 30 minutos. Tras esto, se meten las muestras en el horno a vacío a 30 °C y 200 mbar, durante 24 h. El ángulo de contacto estático se mide con una jeringuilla, dejando una gota de agua sobre la superficie de la membrana, y se fotografía el ángulo formado (θ). La medida se realiza con el software Meazure 2.0 (C Thing Software, EE.UU). También se llevaron a cabo medidas del ángulo de contacto dinámico, durante aproximadamente 3 minutos, empleando el mismo método que el descrito anteriormente.

❖ Microscopía láser confocal (MLCF)

La microscopía láser confocal es una técnica que muestra alta resolución de las imágenes ópticas, con gran selectividad. En este sistema, las muestras deben ser excitadas para emitir fluorescencia, que será recogida por un fotodetector. Este tipo de microscopía, es ampliamente utilizado en el campo de biología celular y biomedicina, ya que, permite generar imágenes tridimensionales de células o tejidos, medir procesos dinámicos, morfología de organoides, etc. También es usado en otras aplicaciones en el campo de la física, química y tecnología alimentaria.

En este caso, se emplea esta técnica para determinar cualitativamente la proteína modelo, Bovine Serum Albumin (BSA) utilizada en este trabajo, sobre la superficie de las membranas. Las muestras utilizadas en este ensayo fueron previamente sometidas a filtración de una disolución de BSA. Para la obtención de las imágenes de estas muestras, en primer lugar, se deben de teñir las muestras con 200 μ l de Matriz Biofilm Ruby (Invitrogen) FilmTracer™ SYPRO®, así provocar la fluorescencia de la proteína. Tras esto, se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y se enjuagaron con agua destilada.

A continuación, se obtuvieron microfotografías mediante un microscopio láser confocal (Nikon A1R). Se usó una excitación de 405 nm, con un filtro

De emisión de 662-737 nm. Las imágenes fueron capturaron al azar con un objetivo x20 (Plan Apo 0.75 NA).

2.1.3 Caracterización de propiedades de transporte

Para la determinación de las propiedades de transporte, flujo de agua y flujo de nutriente, se utilizan los dos tipos de mecanismos de filtración (Figura 2.8): flujo lineal y flujo tangencial o cruzado.

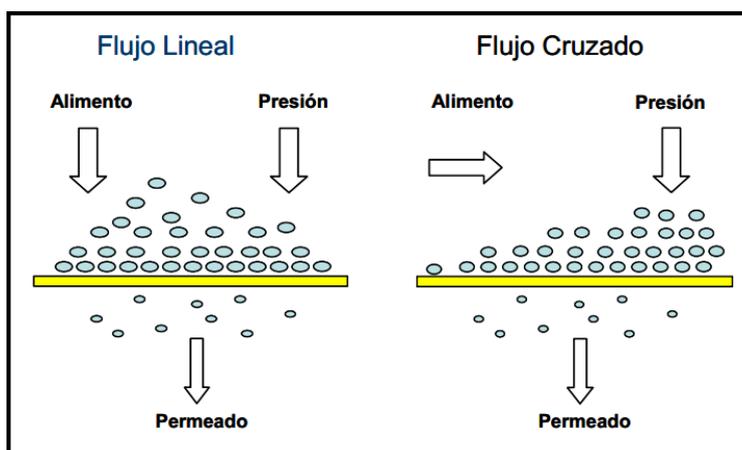


Figura 2.8 Mecanismos de filtración [23].

A continuación, se describen en detalle los dos sistemas experimentales empleados.

- Sistema de flujo lineal

El sistema experimental de flujo lineal se puede observar en la figura 2.9. Este sistema experimental está formado por un tanque presurizado de alimentación de 1L (MILIPORE), válvula manoreductora de presión de aire comprimido (0-10 bar) fijado a 2 bares, manoreductor de líquido (0-2,5 bar), agitador magnético (AGIMATIC SD, SELECTA) y celda de membrana (AMICON CELL), con un área de filtración de 13,4 cm².



Figura 2.9 Sistema experimental de flujo lineal.

- *Sistema de flujo tangencial*

Se trata de un sistema de flujo tangencial continuo (Figura 2.10), formado por un tanque de 500 mL conectado a una válvula (0-4 bar), bomba peristáltica (GILSON MINPULS 3, 0-48 rpm), agitador magnético (VELP), modulo de membrana de flujo tangencial con un área de filtración de 10 cm². En este sistema el retenido se recircula al tanque de alimentación.



Figura 2.10 Sistema experimental Flujo tangencial.

❖ Caracterización de flujo de agua

La caracterización de flujo de agua se llevó a cabo mediante dos metodologías distintas, que se describen a continuación.

Uno de los procedimientos consistió en realizar el mismo procedimiento que el trabajo realizado por Bengoechea, C [20], y así poder comprobar la reproducibilidad de las membranas, con las ya realizadas anteriormente. De esta forma, las muestras fueron lavadas mediante filtración de agua UP, a presión transmembranal constante, de entorno a 0,4 bares para ambos tipos de membrana. Posteriormente, se tomaron medidas de flujo de agua durante 15 minutos para cada valor de presión transmembranal elegido, desde la mínima presión hasta la máxima (subida), y tras esto, se repitió el mismo procedimiento desde la máxima presión a la mínima (bajada). Se calculó el flujo promedio para cada presión, a partir del flujo de subida y de bajada.

Por otro lado, se tomaron datos de flujo de agua con el tiempo, bajo una presión transmembranal constante, de 0,4 bares. En este caso, no se llevó a cabo ninguna etapa de pretratamiento de las muestras. El procedimiento de filtración se repitió una segunda vez para cada muestra de membrana, para así comprobar el comportamiento de las membranas tras sucesivos usos. Las muestras se conservaron sumergidas en agua UP para medidas sucesivas, hasta un máximo de una semana.

En las dos metodologías realizadas, se tomaron medidas del volumen de permeado (L) a lo largo del tiempo (h), obteniendo así el caudal de permeado ($L h^{-1}$). Con el caudal de permeado, se obtuvo el flujo de permeado ($L m^{-2} h^{-1}$), dividiendo entre el área de membrana eficaz.

Uno de los parámetros más importantes en la caracterización de las propiedades de transporte de las membranas es el coeficiente de permeancia de agua. La determinación de dicho coeficiente se puede realizar a partir de la ecuación de flujo [23]:

$$J_w = K_w \cdot \Delta P \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde K_w es la permeancia del agua de la membrana ($L m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$), J_w es el flujo de permeado ($L m^{-2} h^{-1}$), ΔP es la presión transmembranal (bar).

Para determinar la existencia o no de compactación de la membrana, durante el proceso de filtración se determina el factor de caída de flujo (FC) definido como la caída de flujo desde el inicio hasta que se alcanza el estado estacionario, definido de acuerdo a la ecuación 2.4.

$$FC = 1 - \frac{\text{Flujo de agua estado estacionario}}{\text{Flujo de agua inicial}} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

❖ Caracterización de flujo de nutriente

Para llevar a cabo la caracterización de flujo de nutriente, se utiliza la proteína modelo BSA (Sigma Aldrich, A9647. Faction V, $p \geq 96\%$). El peso molecular es de 67 kDa, el tamaño molecular es de $14 \times 4 \times 4$ nm, y el punto isoelectrico (IEP) de esta molécula se encuentra en un pH de 4,7-4,9 [24].

Se realizaron disoluciones de BSA en agua UP 0,4 g/L. Estas, se dejaron reposar en nevera durante la noche anterior al experimento, para eliminar las posibles espumas.

Estos experimentos consisten en filtrar una disolución de BSA a través de las membranas fabricadas. Se fija una presión transmembranal constante en cada sistema experimental, 0,3 y 0,2 bares, para el sistema de flujo lineal y flujo tangencial, respectivamente. Las muestras utilizadas para este ensayo no fueron sometidas a ningún experimento previo, es decir, estaban recién preparadas y no se sometió a un proceso previo de eliminación del preservante de glicerina. Los ensayos se llevaron a cabo durante 10 horas.

En dichos sistemas, se midió el volumen total de permeado (L) con el tiempo (h), obteniendo así el caudal de permeado ($L h^{-1}$). Dividendo entre el área de

filtración (m^2), de cada sistema experimental, se obtuvo el flujo total de permeado J_T ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$). Conocido el flujo total de permeado, se calculó la permeabilidad total K_T de disolución de BSA ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$), mediante la ecuación 2.5.

$$J_T = K_T \cdot \Delta P \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Por otro lado, también se midieron las concentraciones de BSA a lo largo del tiempo, cogieron muestras periódicas de 3 mL del permeado y del tanque de alimentación, con ayuda de una micropipeta (Eppendorf, 10 mL). Las concentraciones de BSA fueron medidas en un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (UV-1800, Shimadzu) con una longitud de onda de 280 nm. Se realizó la recta de calibrado para concentraciones de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2 y 0,4 g/L de BSA, la cual se observa en la Figura 2.11.

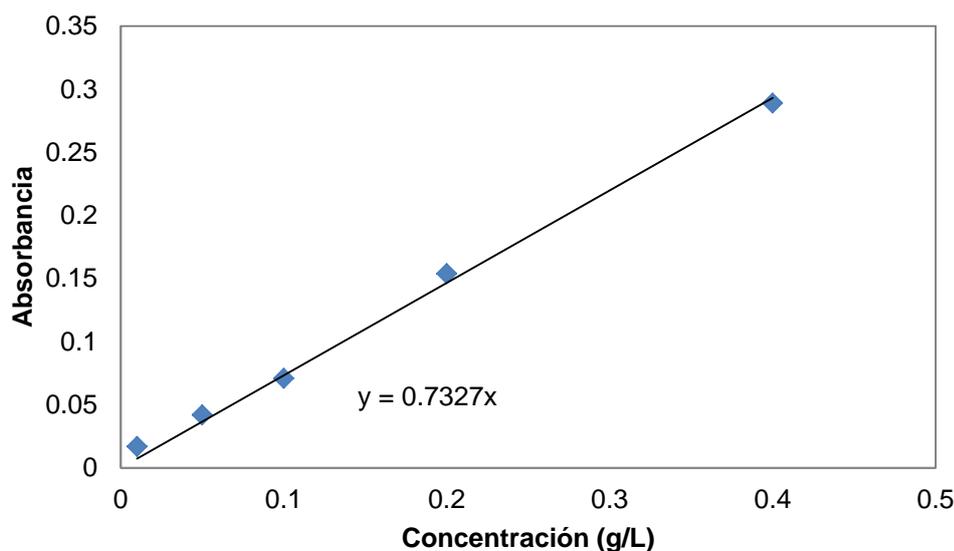


Figura 2.11 Absorbancia para las distintas concentraciones de disoluciones de BSA en agua UP

Conocida la concentración de BSA en el permeado, se calculó el flujo de BSA, J_{BSA} ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$), en el permeado mediante la siguiente expresión:

$$J_{BSA} = J_T \cdot C_P \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Donde C_P es la concentración de BSA (g L^{-1}) en el permeado.

Mediante el valor del J_{BSA} en el permeado, se obtuvo también, la permeancia de BSA, K_{BSA} ($L\ m^{-2}\ h^{-1}\ bar^{-1}$), mediante la ecuación 2.7.

$$J_{BSA} = K_{BSA} \cdot \Delta P \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Finalmente, conocidas las concentraciones de BSA tanto de tanque de alimentación, C_T ($g\ L^{-1}$), como la concentración del permeado, C_P ($g\ L^{-1}$), se calculó el rechazo (R) de BSA (%) a través de la ecuación 2.8

$$R = \frac{C_T - C_P}{C_T} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.8}$$

Tras los ensayos de filtración en el sistema lineal, se analizaron los ángulos de contacto dinámicos y se hizo MLCF de las muestras.

2.1.4 Adsorción de proteínas

La adsorción de proteínas en la superficie de las membranas es el primer paso para estudiar la biocompatibilidad de los scaffolds con la sangre, dado que si este valor es elevado, puede dar lugar a la generación de trombos. Por otro lado, se han desarrollado estudios, en los cuales, se demuestra que una pequeña cantidad de proteína sobre la superficie de los soportes mejora la unión de las células a estos soportes.

En este ensayo se evaluó la adsorción de la proteína modelo BSA, ya que es una de las proteínas más estudiadas, que se encuentra en mayor proporción tanto en el torrente sanguíneo, como en los medios de cultivo.

Para ello, se siguió el procedimiento desarrollado por Ishihara et al [25], en donde, la adsorción de proteína se obtiene al poner en contacto las membranas con una disolución de proteínas.

Se recortaron muestras de membranas de $4\ cm^2$, y cada muestra se introdujo en un tubo de falcon en contacto con 50 mL de una disolución de

0,4 g/L de BSA en agua UP. Se deja durante 48 h agitando en un contactor rotatorio (SBS Instruments, 0-10 rpm) a temperatura ambiente. Tras el contacto, se enjuagaron las muestras ligeramente con agua UP para quitar los posibles restos de proteína no adsorbida. A continuación, se pone en contacto cada muestra en 15 mL con una disolución de dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% en volumen, y se dejó agitando de nuevo en el rotatorio durante 48 h. Con esto, se consigue que la proteína adsorbida en la membrana se redissuelva en la disolución de SDS. Posteriormente, se midió la absorbancia de esta disolución en el espectrómetro. La recta de calibrado (figura 2.12) se realizó para concentraciones de 0,04, 0,2 y 0,4 g/l de BSA en SDS, al 1% en volumen.

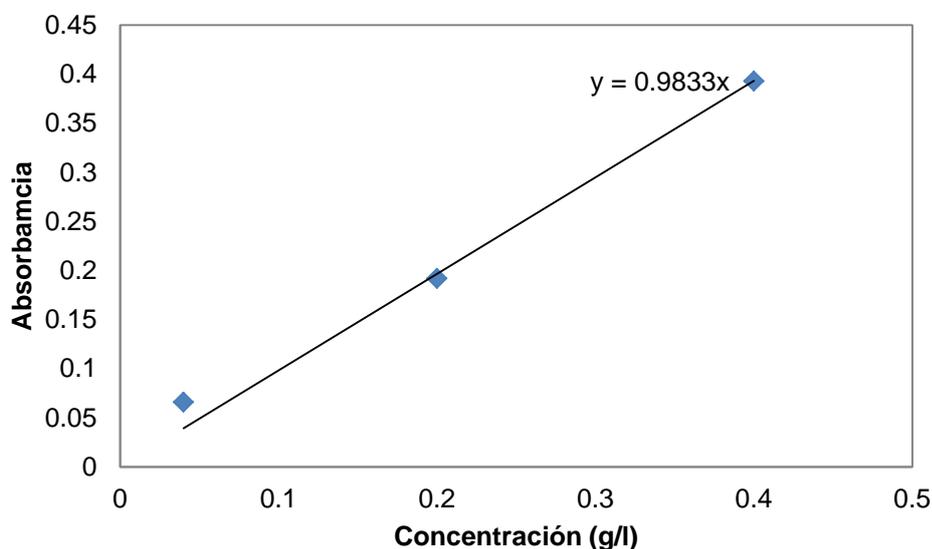


Figura 2.12 Absorbancia para las distintas concentraciones de disoluciones de BSA en en SDS al 1% en volumen

2.1.5 Viabilidad del cultivo celular

Por último, se evaluó la viabilidad de la adherencia celular sobre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, para su aplicación en IT. Para ello, se llevaron a cabo cultivos estáticos de crecimiento celular, durante 48h. Se seleccionó una línea celular de glioblastoma humano U87 (ATCC HTB 14), que son células tumorales del cerebro, y fue mantenida en medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM), cuya composición se encuentra recogido en

el ANEXO II, suplementado con 10% de suero de ternera y agentes antibióticos (penicilina G, 100 U mL⁻¹, y estreptomina, 100 mg mL⁻¹) en una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5% a 37 °C.

Los soportes de 26 mm de diámetro se colocaron en adaptadores de acero inoxidable (juntas tóricas, Okolab) y se esterilizaron por inmersión en una solución de etanol al 70% durante 5 min y secado al aire. La figura 2.13 muestra los soportes colocados dentro de las juntas tóricas, llenado con el medio de cultivo. Las células se trataron con tripsina en matraces celulares, y tras esto, se volvieron a suspender en el medio de cultivo. Posteriormente, se depositaron las células uniformemente sobre los soportes con una densidad celular de $1,6 \cdot 10^5$ células/cm². Las juntas tóricas que contienen los soportes y las células se incubaron durante 48 h en una atmósfera humidificada de dióxido de carbono al 5% a 37 °C. Cada tipo de membrana, PCL/EtOH y PCL/IPA, se cultivo por duplicado para las pruebas analíticas descritas a continuación.

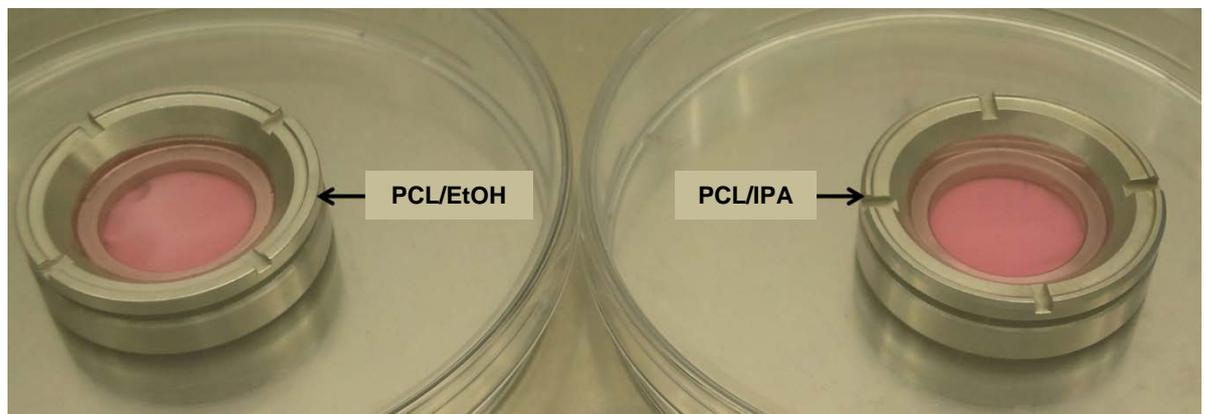


Figura 2.13 Imagen de la vista superior de los dos tipos soportes de cultivo celular en estático.

Estos ensayos se llevaron a cabo en el Servicio de Microbiología del Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL del Hospital Marqués de Valdecilla.

❖ MLCF para viabilidad celular

Esta técnica permite cuantificar de forma cualitativa la adherencia celular sobre los soportes tras 48 h de cultivo estático. Así, tras la incubación, las células se fijaron con 3% de glutaraldehído helado durante 20 min a 4 °C, se permeabilizaron con Triton X-100 (0,1 % en PBS) durante 5 min a temperatura ambiente, y se lavaron tres veces con PBS.

Atto-488 faloidina (Sigma), que forma uniones poliméricas con F- actina, se utilizó para identificar los filamentos de actina y fibras. Por otro lado, también se utilizó una gota por mL de NucBlue (Molecular Probes) para teñir los núcleos. También se aplicó un volumen de 1µL de Mito Tracker Red CMX Ros (Molecular Probes) de una solución de stock de 1µM, durante 30 min a cada soporte para teñir las mitocondrias.

Para la microscopía, los soportes se invirtieron, y una serie de las secciones ópticas fueron obtenidas con un microscopio laser de barrido confocal Nikon AIR equipado con 403 nm, 488 nm y 561 nm láser para detectar núcleos, actina polimerizada y mitocondrias, respectivamente.

Las reconstrucciones de las secciones de confocal fueron ensambladas usando el software NIS221Elements 3.2.

❖ SEM para viabilidad celular

Para llevar a cabo este ensayo las células cultivadas sobre los soportes se fijaron mediante glutaraldehído helado y se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol graduado, lo que se conoce como el método del punto crítico. Una vez secas las muestras, se recubrieron con oro, generando una película fina pulverizada de iones JFC-1100 (JEOL). Finalmente, se observaron con un microscopio Inspect S (Compañía FEI), trabajando a 25kV.

2.1.6 Tratamiento estadístico de los resultados

Los resultados se muestran como valores promedio \pm desviación estándar de los ensayos de caracterización física y propiedades de transporte para los dos tipos de membranas independientes (PCL/EtOH y PCL/IPA). Se analizó mediante el método estadístico t de Student ($p < 0,05$). El número de muestras de cada población varía entre 2-9 según el tipo de ensayo.

2.2 Resultados y discusión

2.2.1 Caracterización física

Para llevar a cabo el estudio de las propiedades de transporte de los dos tipos de membranas, PCL/EtOH y PCL/IPA, previamente desarrolladas en el grupo [20,21], se fabricaron nuevas membranas. Para comprobar la reproducibilidad del método de fabricación, se repitieron los experimentos de caracterización ya realizados en trabajos anteriores (ángulo de contacto, porosidad y espesor) y se llevaron a cabo algunos otros ensayos adicionales, que se incluyen en el presente trabajo (porometría de flujo capilar, SEM, ángulo de contacto dinámico). A continuación, se muestran los resultados obtenidos para los distintos ensayos realizados.

❖ Espesor de membrana y porosidad

En la tabla 2.1 se recogen los resultados de espesor de membrana (δ), la porosidad obtenida mediante queroseno (ε_k), y mediante IPA (ε_i).

Tabla 2.1 Espesor, porosidad mediante queroseno, y porosidad mediante isopropanol, para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$.

Parámetros	PCL/EtOH	PCL/IPA
δ (μm)	139 \pm 20	141 \pm 23
ε_k (%)	84,1 \pm 0,15	84,9 \pm 0,32

ε_i (%)	79,1 ± 0,56 *	75,8 ± 0,53 *
---------------------	---------------	---------------

Según los resultados que se muestran en la tabla 2.1, cabe destacar que, los espesores hallados no presentan diferencias significativas entre los dos tipos de membranas, y menores que el espesor inicial fijado en la fabricación de membranas (200 μm). Esto viene dado por la compactación progresiva de la estructura polimérica durante el proceso de precipitación, dada la diferente rigidez de la estructura porosa [20]. Los resultados se corresponden con resultados obtenidos en el anterior trabajo [21].

Por otro lado, se realizó la medida de porosidad de las muestras con dos disolventes, para comprobar que no estaban ocurriendo fenómenos de hinchamiento o disolución de polímero con el queroseno, dada la posible existencia de estos fenómenos en membranas poliméricas con disolventes orgánicos [26]. El resultado de los dos tipos de disolventes presentan diferencias significativas, pero dentro del mismo orden, descartando cualquier comportamiento anómalo entre la membrana y el disolvente.

En nuestras membranas, las porosidades se encuentran en un rango de 79-84% para PCL/EtOH, y 75-89% para PCL/IPA, en función del disolvente empleado en el estudio. Estos valores sugieren una elevada porosidad, similar a la obtenida en los anteriores artículos, y suficiente como para justificar su aplicación en el cultivo de tejidos celulares de acuerdo a lo indicado en trabajos anteriores [27]. Además, estos valores se corroboran con resultados ya obtenidos previamente por Karande et al [28], en donde se muestran distintos polímeros fabricados por separación de fases obteniendo porosidades en el rango de 85-97%.

❖ Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La estructura y morfología de la superficie y de la sección transversal de las membranas, se muestran en la figura 2.14.

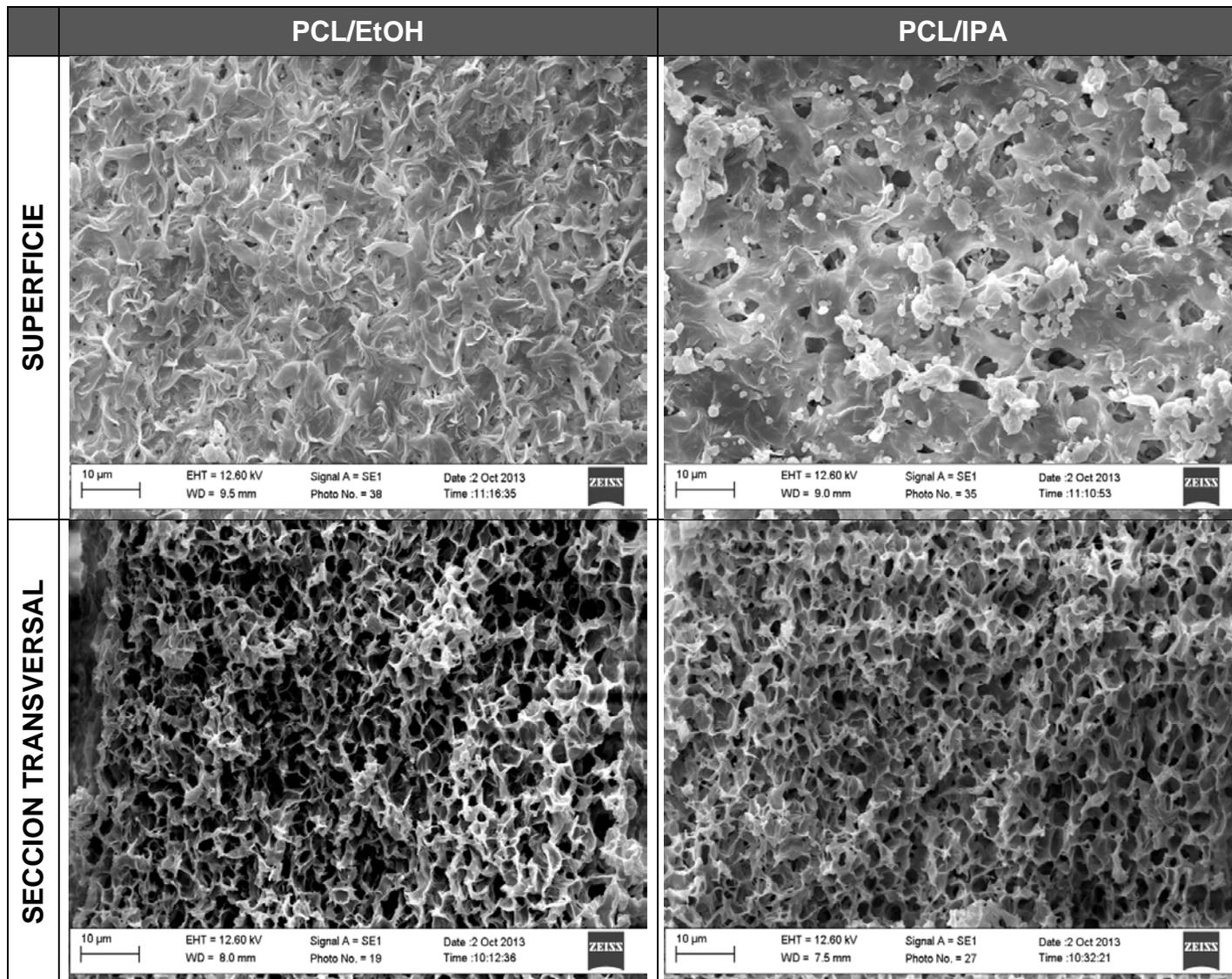


Figura 2.14 Imágenes de SEM de superficie y sección trasversal para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA.

Las imágenes de SEM de la sección transversal, muestran membranas simétricas porosas. La membrana PCL/IPA presenta una superficie con formación de glóbulos y un tamaño de poro superficial mayor, que para la membrana PCL/EtOH, la cual, muestra en la superficie estructuras en forma de escamas. Sin embargo, en cuanto a la sección transversal, se observa una estructura y tamaño de poro similar entre ambos tipos de membranas.

❖ Porometría de flujo capilar

El tamaño de poro es importante para la posible infiltración de las células dentro del soporte, tras comenzar el cultivo. Esto puede afectar a la distribución de células y por consiguiente la uniformidad del tejido.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de porometría de flujo capilar. Mediante esta técnica, se obtiene la distribución del tamaño de poro, al aplicar presión, sobre las muestras de membranas mojadas, y así, vaciar paulatinamente los poros.

En las figuras 2.15 y 2.16, se muestran los resultados representativos para PCL/EtOH y PCL/IPA, respectivamente. El resto de resultados se recogen en el ANEXO III.

En las figuras 2.15 (A) y 2.16 (A), se muestra la evolución del flujo a través de la membrana, tras la aplicación de presión de aire seco. Al comenzar el aumento paulatino de presión sobre la muestra mojada, hay una pequeña resistencia hasta la apertura de los primeros poros, más grandes, hasta llegar a abrir los poros más pequeños, presión máxima. Tras esto se vuelve a repetir el experimento sobre la membrana ya seca, en donde los poros ya están abiertos y se obtiene una tendencia lineal con la presión. A partir de la relación de Washburn (Ecuación 2.2) se obtiene la distribución de tamaño de poro, en función de la diferencia entre las curvas de flujo de la subida, *Wet Run*, con la bajada, *Dry Run*. Esta distribución se representa en las figuras 2.15 (B) y 2.16 (B).

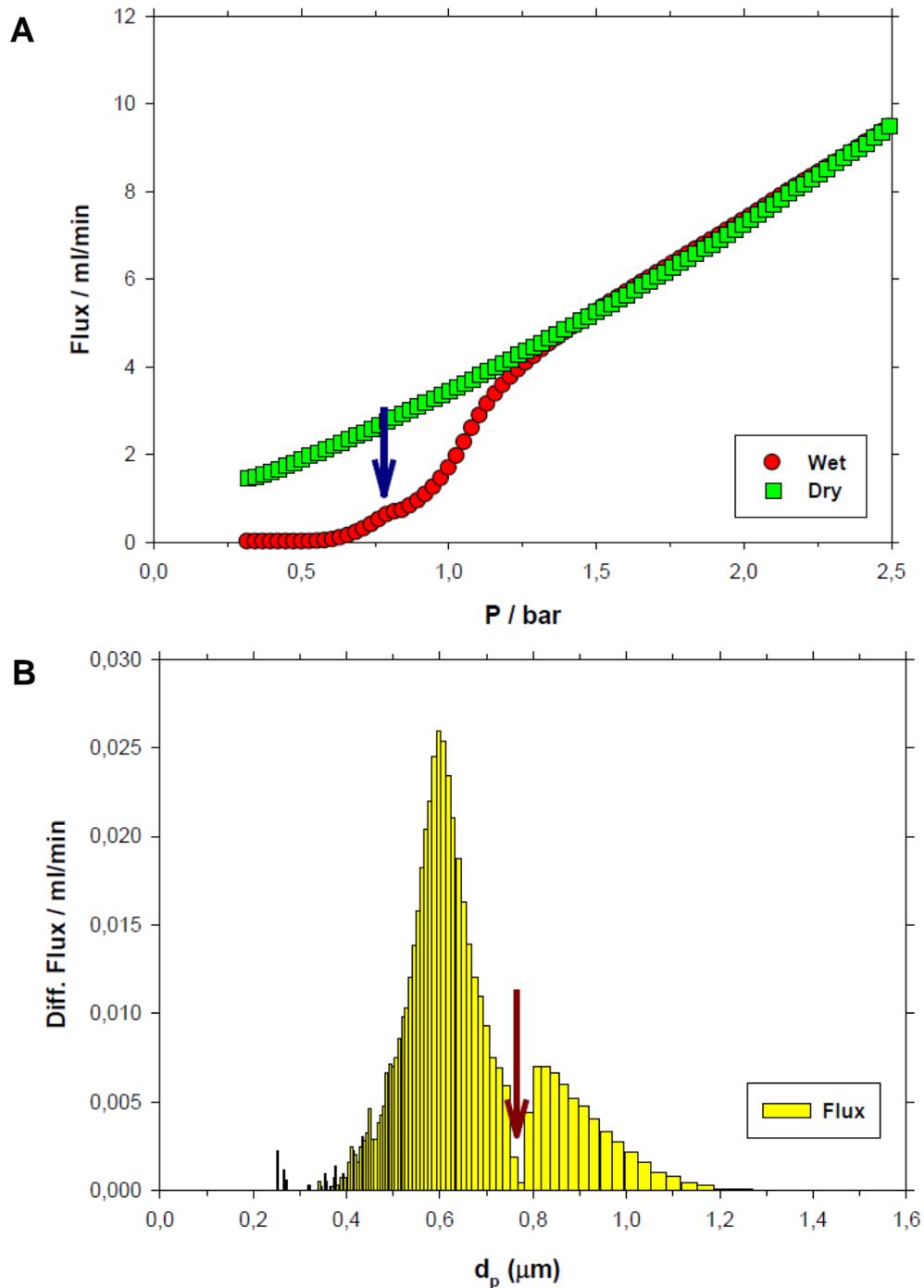


Figura 2.15 A: Flujo a través de la membrana aplicando presión de aire. B: Distribución del tamaño de poro para la membrana de PCL/EtOH.

Según la figura 2.15 (B) se observa que alrededor de 0,8 μm se produce un hueco, consecuencia del paso interno que realiza el equipo del medidor de flujo, para flujos bajos usando el de flujos más altos. Se observa que el tamaño de poro que aparece con más frecuencia está entorno a 0,6 μm .

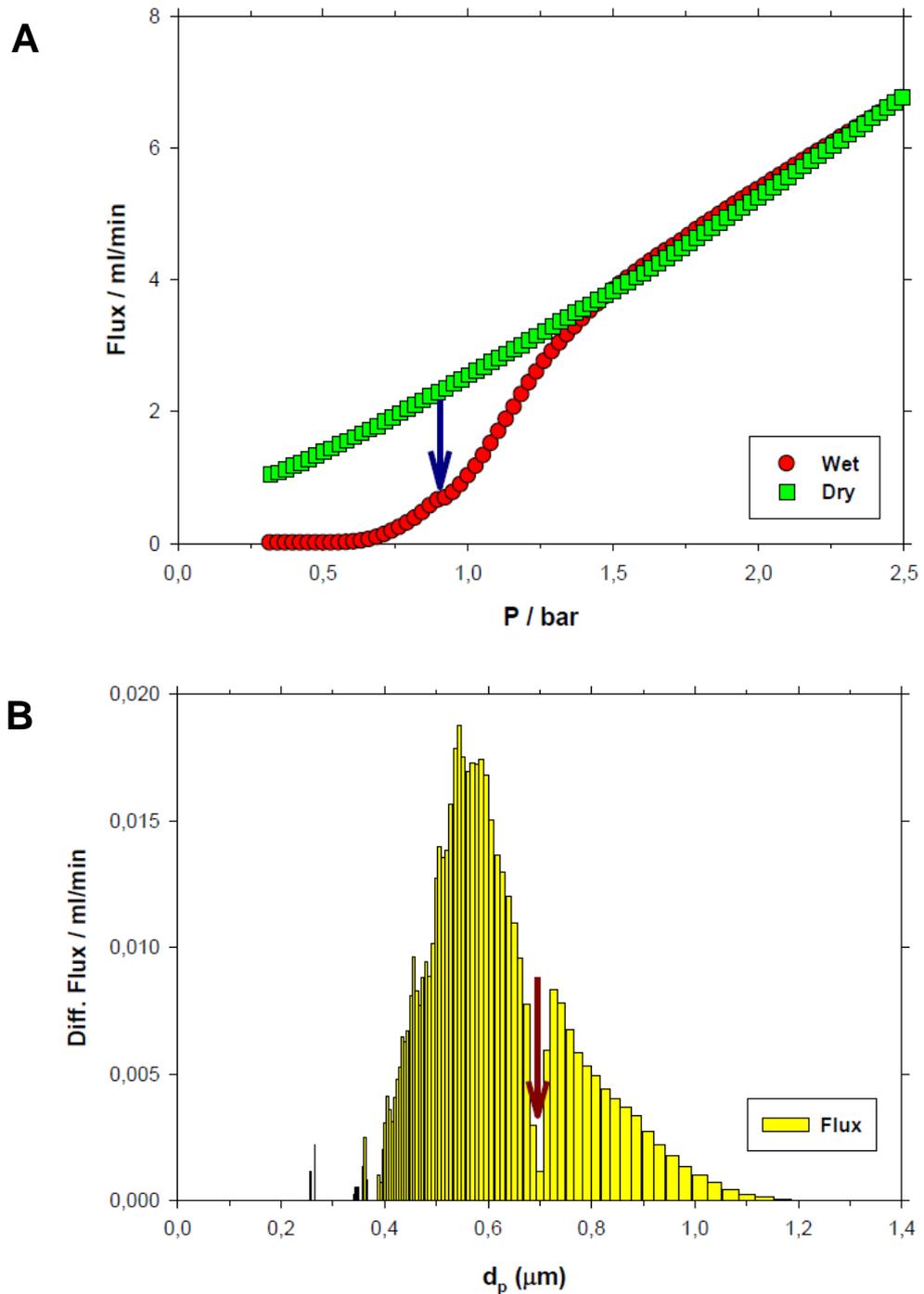


Figura 2.16 A: Flujo a través de la membrana aplicando presión de aire. B: Distribución del tamaño de poro para la membrana de PCL/IPA.

Como ocurría anteriormente, en la figura 2.16 (B) se observa que alrededor de 0,7 μm el hueco de cambio de flujos.

Los valores de tamaño medio de poro para cada tipo de membrana se recogen en la tabla 2.2

Tabla 2.2 Tamaño medio de poro a partir de la porometría de flujo capilar, para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 7$.

	PCL/EtOH	PCL/IPA
d_p (μm)	$0,60 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,09$

Comparando los resultados de tamaño de poro para los dos tipos de membrana, se comprobó que no había diferencias significativas. Esto ya se observaba cualitativamente, en las imágenes de sección transversal del SEM.

Por otro lado, valores similares a estos tamaños de poro, ya fueron obtenidos por Diban et al [29], para membranas de fibra hueca de PCL realizadas por electrospinning, obteniendo un rango tamaño de poro entre $0,5\text{-}3,5 \mu\text{m}$.

❖ Ángulo de contacto estático

En la figura 2.17 se representan las imágenes de dos muestras representativas del ángulo de contacto para PCL/EtOH y PCL/IPA, y sus valores promedio y desv. estándar .

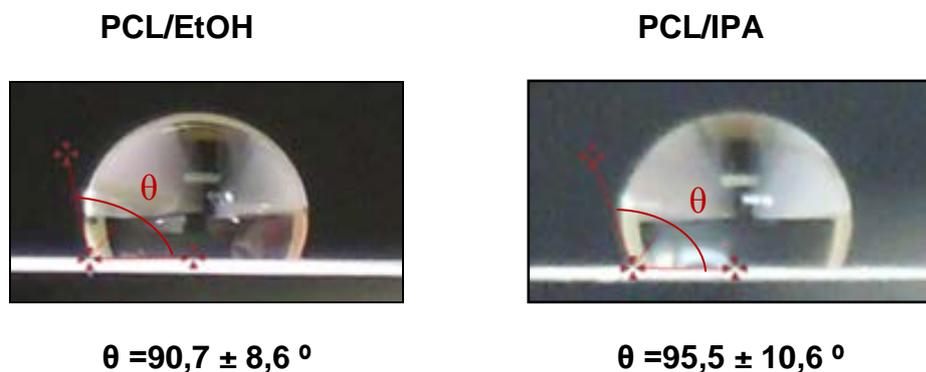


Figura 2.17 Imágenes del ángulo de contacto para las membranas PCL/EtOH y PCL/IPA. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 7$.

Según se observa en la figura 2.17, el valor medio del ángulo de contacto, para ambos tipos de membranas, muestran un carácter hidrófobo ($>90^\circ$), dado que la PCL es hidrófoba. Analizando los dos tipos de membranas, no hubo diferencias significativas entre los valores de ángulo de contacto, ni con los trabajos realizados previamente [20,21].

Otros trabajos desarrollados para membranas de PCL, muestran valores similares de ángulo de contacto. Morelli et al [30], fabrican membranas de PCL mediante inversión de fases con otros disolvente, dando un ángulo de contacto de 78° . Por otro lado, membranas de PCL fabricadas mediante electrospinning muestran similar ángulo de contacto, entorno a 100° [31].

2.2.2 Caracterización de propiedades de transporte

❖ Caracterización de flujo de agua

A continuación, se muestran los experimentos realizados según la metodología seguida para la comprobación de la reproducibilidad de permeancia de agua, en comparación con las membranas ya realizadas en trabajos anteriores [20,21].

La figura 2.18 muestra un caso representativo de los resultados obtenidos, de esta metodología. En esta figura, se representan el flujo promedio y desv. estándar para cada valor de presión en los ciclos de subida y bajada de presión, en el sistema de flujo lineal, para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA.

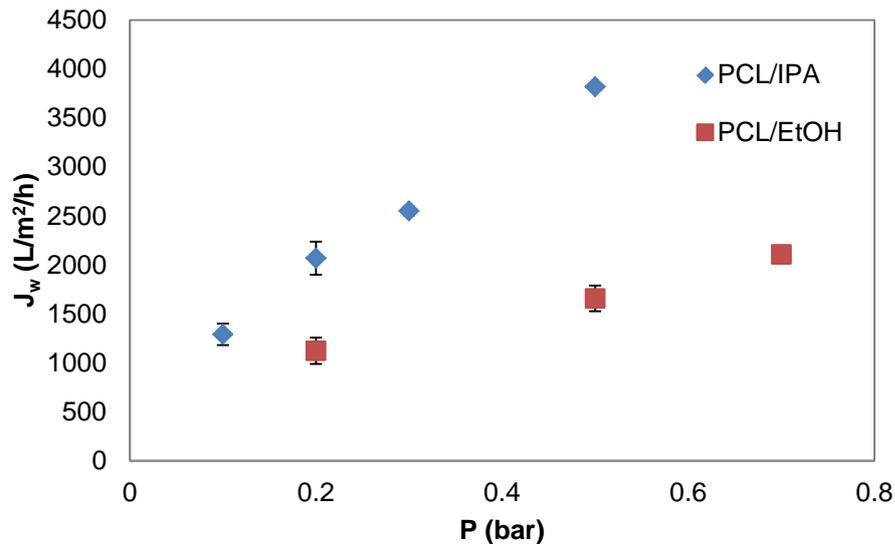


Figura 2.18 Valores de flujo promedio de agua UP a distintas presiones transmembranales, durante el ensayo de ciclo de subida y bajada de presión, a través de membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal.

Según la figura 2.18, los flujos obtenidos para las membranas fabricadas de PCL/EtOH y PCL/IPA, para una presión de 0,2 bares, 1124 ± 135 y 2069 ± 169 , respectivamente, son similares a los obtenidos en trabajos anteriores, para una presión de 0,2 bares, 1093 ± 94 y 1852 ± 161 , respectivamente [20].

Sin embargo, el flujo de agua no presenta una tendencia lineal con los distintos valores de presión transmembranal. Este fenómeno también se obtuvo para el sistema de flujo tangencial.

Para la justificación de este fenómeno, se llevó a cabo el estudio de sucesivos ciclos de subida y de bajada de presión. A continuación, se muestra este ensayo sobre una de las muestras de PCL/EtOH, en el sistema de flujo tangencial (figura 2.19), observándose, que el flujo de agua a cada valor fijo de presión (figura 2.19 A), va descendiendo a lo largo del tiempo, hasta tomar valores estables a partir de 3h de experimento. Por tanto, se considera que en ese punto se alcanza el estado estacionario, y es donde se realizó la medida de permeancia, determinada como la pendiente de la representación de flujo frente a la presión transmembranal de acuerdo a la

ecuación 2.3, cuando se alcanza la linealidad, es decir, en el estado estacionario, tal y como se representa en la figura 2.19 B.

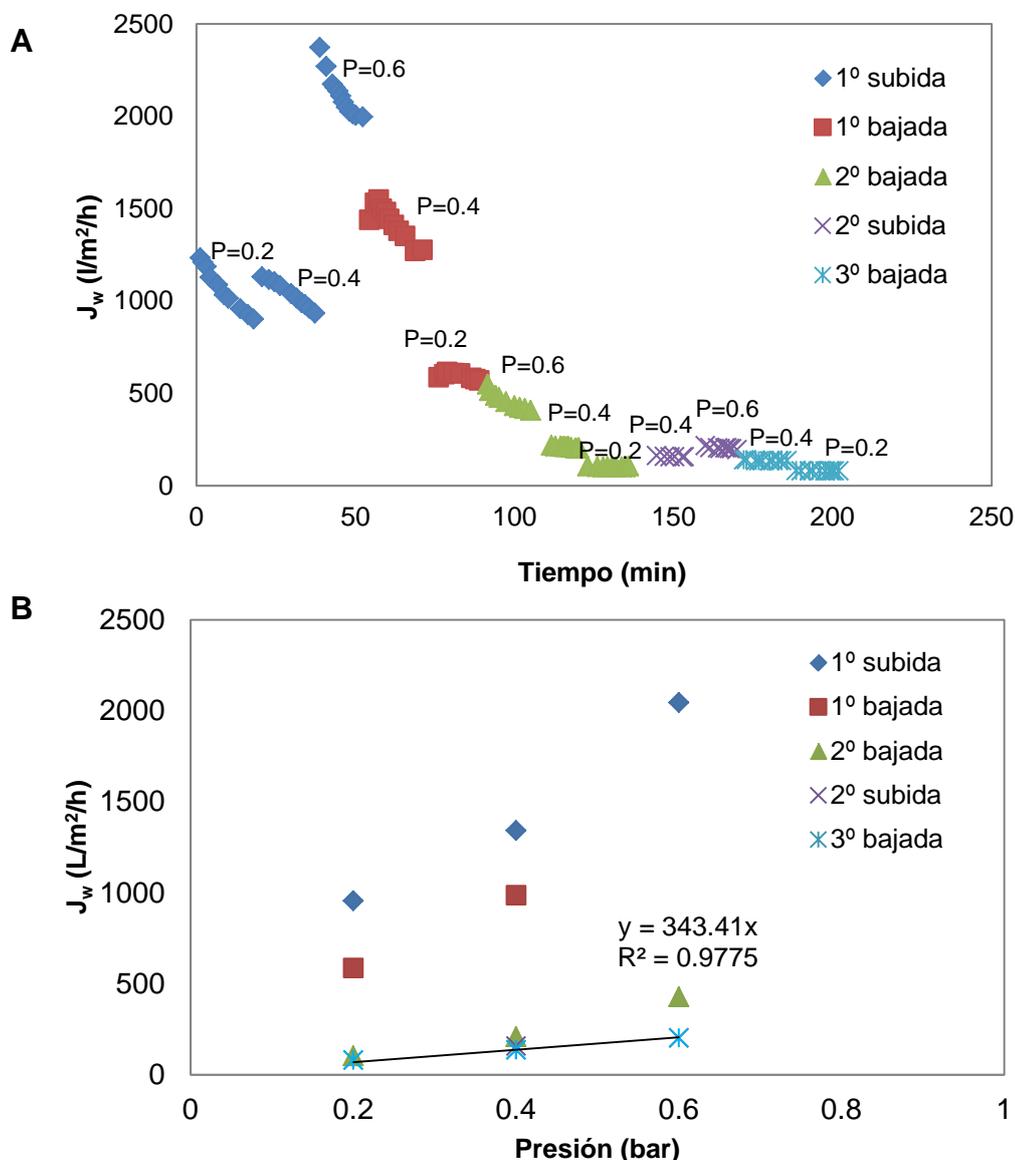


Figura 2.19 A: Flujo de agua ultrapura a distintas presiones transmembranales a lo largo del tiempo. **B:** Flujo de agua ultrapura promedio para cada presión. Para la membrana PCL/EtOH para los distintos ciclos de subida y bajada, en el sistema de Flujo tangencial.

El valor de permeancia que se observa en la figura 2.19 ($343 L m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$), es de un orden de magnitud menor que el que se obtenía en trabajos anteriores para estas membranas ($5277 \pm 906 L m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$) [20]. Este desarrollo se realizó de forma similar para PCL/IPA ($466 L m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$ y

$6745 \pm 1962 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$, respectivamente), obteniendo el mismo comportamiento. Se atribuyó este fenómeno de caída de flujo, a la compactación de la membrana polimérica, durante los ensayos de filtración bajo presión. Dado este resultado, se desarrollaron experimentos de caracterización de flujo de agua durante tiempos más largos de operación para conocer la evaluación de la caída de flujo con el tiempo hasta la estabilidad, y evaluar el valor de permeancia en el estado estacionario.

Los ensayos más representativos se muestran a continuación, todos ellos realizados bajo una presión constante, de 0,4 bares. En el ANEXO IV, se recogen el resto de resultados.

En la figura 2.20 y 2.21 se representa el flujo de agua adimensional ($J_{w, \text{adim}}$) definido en la ecuación 2.9, frente al tiempo en el sistema de flujo lineal, para muestras de las membranas PCL/EtOH y PCL/IPA, respectivamente.

$J_{w, \text{adim}}$ se define como el cociente del flujo de agua UP (J_w) medido a lo largo del tiempo, entre el flujo inicial ($J_{w,0}$) que presentaba la muestra, según la siguiente ecuación:

$$J_{w, \text{adim}} = \frac{J_w}{J_{w,0}} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

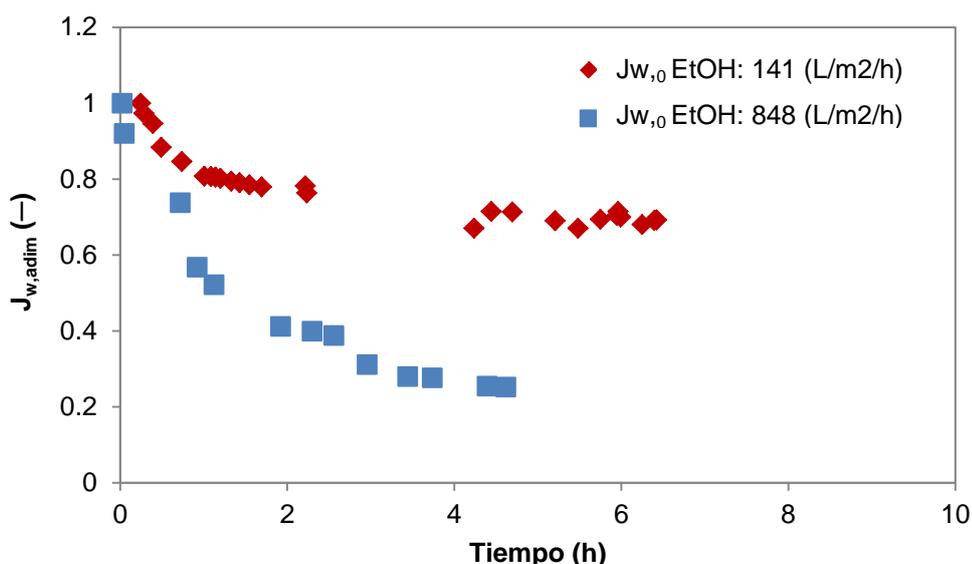


Figura 2.20 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal.

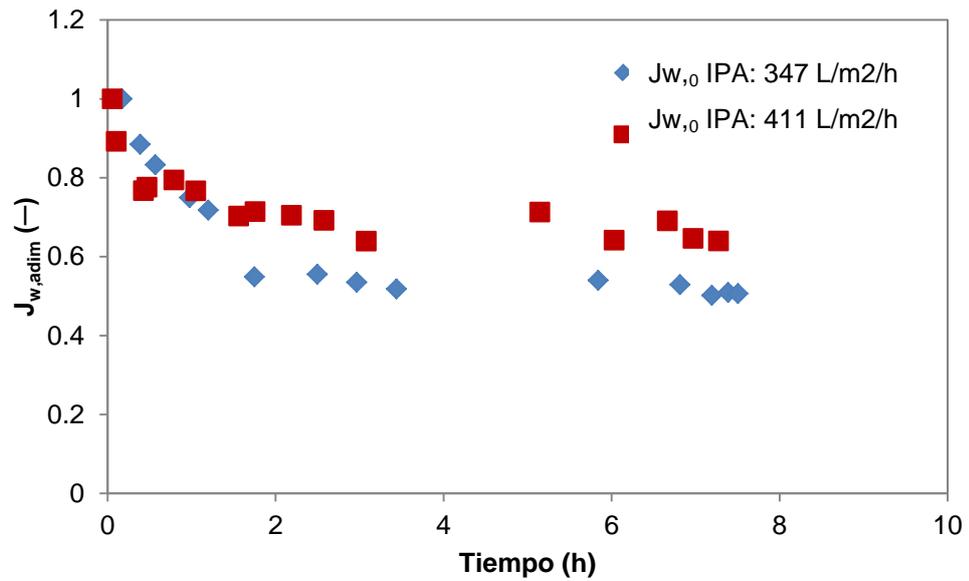


Figura 2.21 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal.

En las figuras 2.22 y 2.23 se representa el flujo de agua adimensional frente al tiempo, en el sistema de flujo tangencial, para las membranas PCL/EtOH y PCL/IPA, respectivamente.

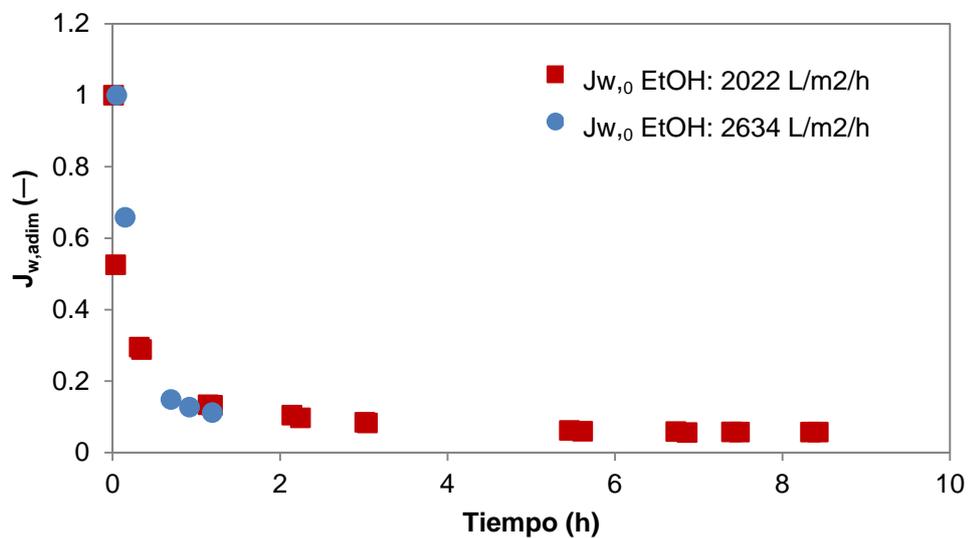


Figura 2.22 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial.

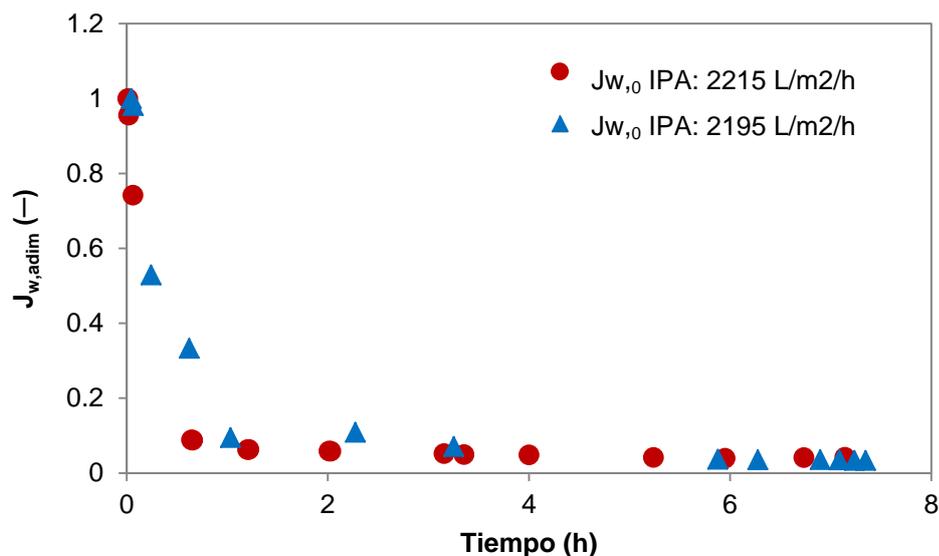


Figura 2.23 Evolución del flujo adimensional de agua ultrapura con el tiempo para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial.

Según los resultados anteriores, se observa una gran variabilidad en el valor de $J_{w,0}$ entre las distintas muestras de PCL/EtOH y PCL/IPA, en un rango entre $141\text{--}2634\text{ L m}^{-2}\text{ h}^{-1}$. Esta variabilidad podría estar asociada al método de fabricación, dado que, el error humano y las condiciones ambientales afectan directamente sobre las membranas fabricadas.

Además, analizando las figuras 2.20 y 2.21, se observa que el valor de $J_{w,0}$ influye en el comportamiento de la membrana. Así, si $J_{w,0}$ es distinto entre las muestras (figura 2.20), la caída de flujo es mayor cuando el $J_{w,0}$ es mayor. Por el contrario, cuando el $J_{w,0}$ es similar (figura 2.21), el comportamiento del flujo a lo largo del tiempo es similar.

De forma general, el sistema de flujo tangencial muestra una caída más brusca de flujo (figura 2.22 y 2.23) alcanzando, por tanto, el estado estacionario en menor tiempo, 2-3 h, que el sistema de flujo lineal, que presenta una caída más progresiva (figura 2.20 y 2.21), alcanzando el estado estacionario en 4-5 h.

La cuantificación de los resultados en el estado estacionario se representan en la figura 2.24, en donde se muestran los valores de flujo y de permeancia de agua UP, obtenida esta, como el cociente entre el flujo en estado estacionario y la presión transmembranal.

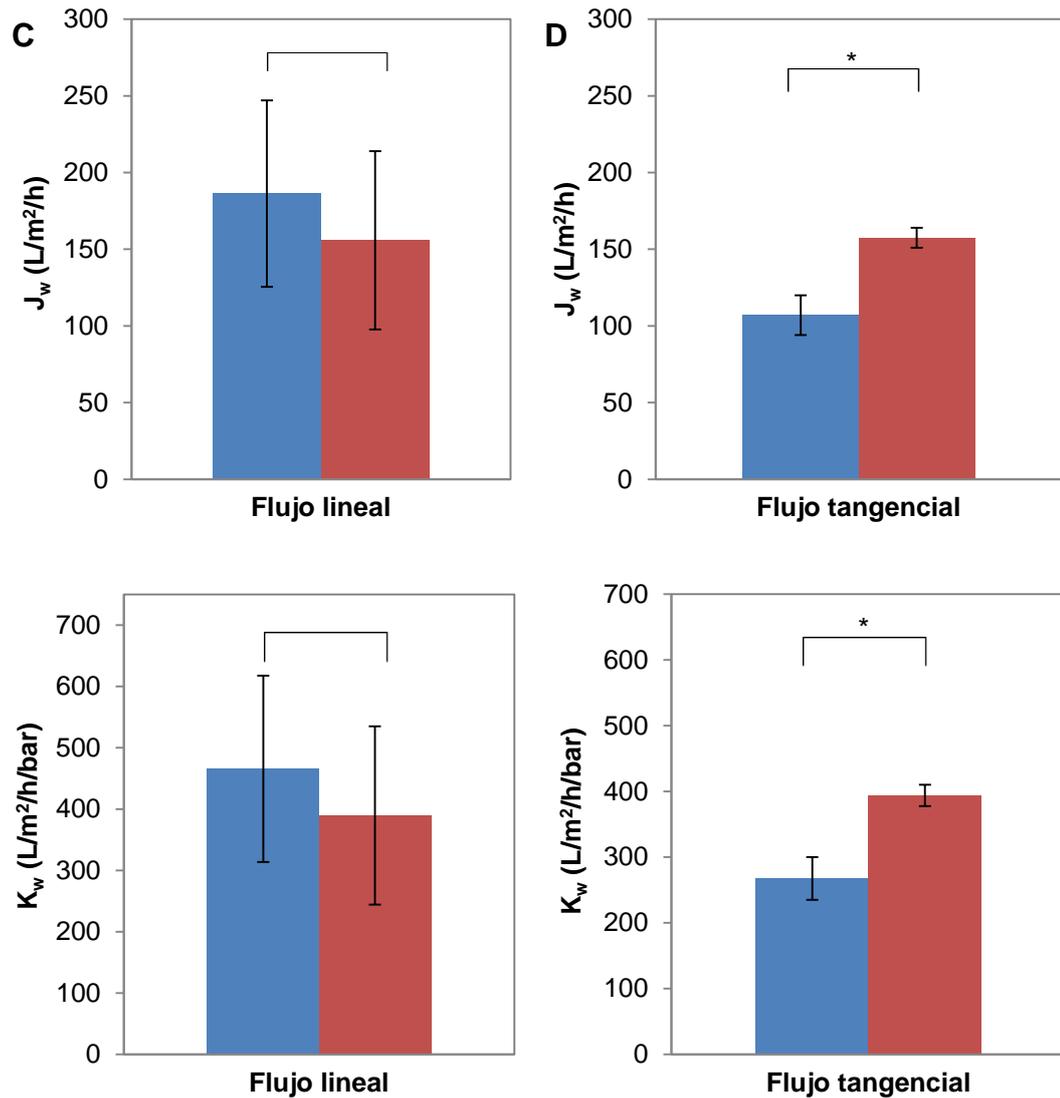


Figura 2.24 Flujo (A y B) y permeancia (C y D) de agua UP en el estado estacionario, para las membranas PCL/EtOH, en rojo, y PCL/IPA, en azul, para los dos tipos de sistemas de configuración de flujo. * Diferencias significativas entre las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, y entre los dos sistemas experimentales para cada tipo de membrana, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$.

Según los resultados obtenidos en la figura 2.24, se obtienen las siguientes observaciones:

- Para la membrana de PCL/EtOH y PCL/IPA, se compara el flujo en el estado estacionario para el sistema de flujo lineal (156 ± 58 y 186 ± 61 , respectivamente), con el obtenido en el sistema de flujo tangencial (158 ± 7 y 107 ± 13 , respectivamente). No se encontraron

diferencias de flujo, analizando por separado cada tipo de membrana, comparado entre los distintos sistemas de configuración de flujo.

- Comparando los resultados de PCL/EtOH con PCL/IPA se observa que en el sistema de flujo lineal (156 ± 58 y 186 ± 61 , respectivamente), no hay diferencias significativas entre el flujo en el estado estacionario de ambas membranas. Sin embargo, en el sistema de flujo tangencial (158 ± 7 y 107 ± 13 , respectivamente), si existen diferencias significativas entre el flujo en estado estacionario de PCL/EtOH con el obtenido para PCL/IPA.

Por tanto, se observa que de forma general, pese a la gran dispersión de $J_{w,0}$, en el estado estacionario de forma general, los resultados de flujo y permeancia son similares.

En general, en el sistema de flujo tangencial, los valores finales presentan menos desviación que en el caso del sistema lineal. Esto viene dado, porque los flujos iniciales en el sistema de flujo tangencial son más similares entre las distintas muestras, que en el caso del sistema de flujo lineal, en donde hay más dispersión de estos valores. Además, se observa que la membrana de PCL/IPA, se ve sometida a una compactación mayor en el sistema de flujo tangencial.

A partir de estos valores finales del estado estacionario, se calcula el valor de factor de caída de flujo (FC), definido en la ecuación 2.4, que nos da una idea de la caída de flujo hasta alcanzar el estado estacionario durante la filtración de agua, que se ha atribuido a un fenómeno de compactación de la membrana sometida a presión. Este factor se presenta en la figura 2.25 para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, para el sistema de flujo lineal y tangencial.

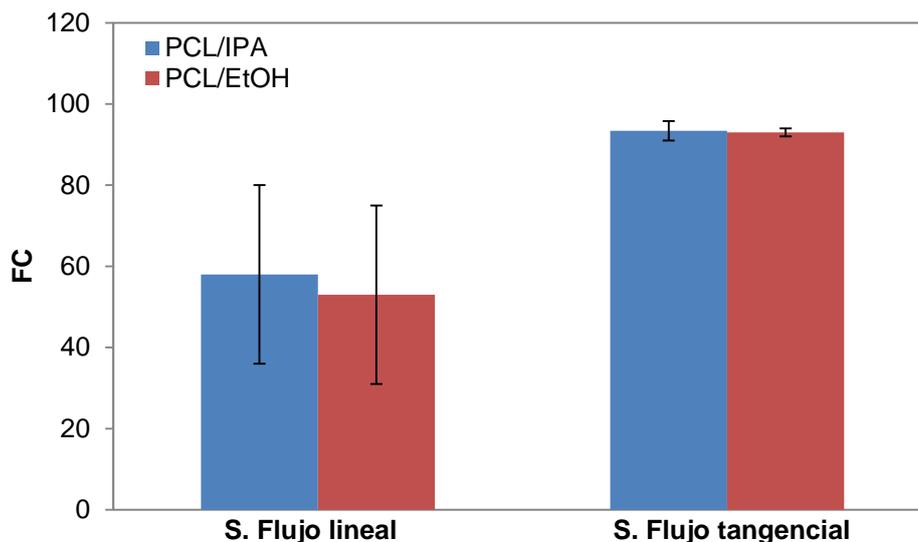


Figura 2.25 Factor de compactación de la membrana PCL/EtOH y PCL/IPA, cada sistema de configuración de flujo.

Según lo obtenido en la figura 2.25, se corrobora las observaciones anteriormente citadas, ya que la compactación es mayor en el sistema de flujo tangencial, de 93 ± 1 y 93 ± 2 , para PCL/EtOH y PCL/IPA respectivamente, mientras que la compactación obtenida en el sistema de flujo lineal es aparentemente menor, de 53 ± 22 y 58 ± 22 , respectivamente. No se realizaron análisis estadísticos en este caso, por la escasa muestra ($n=2$) poblacional.

Una vez realizados estos experimentos de caracterización de flujo, se procede a repetir sobre las muestras anteriores, la misma medida de flujo, para determinar el comportamiento de estas membranas tras sucesivos usos. Estos experimentos de repetición se realizaron nuevamente a una presión de 0,4 bares. Tal y como se ha indicado anteriormente, las muestras se conservaron sumergidas en agua UP con un tiempo máximo de una semana, hasta su segundo uso.

A continuación, se muestra uno de los resultados representativos de este experimento. El resto de resultados se encuentran recogidos en el ANEXO IV. En la figura 2.26 se representa el flujo de agua utrapura a lo largo del tiempo, para la membrana de PCL/EtOH en el sistema de flujo lineal.

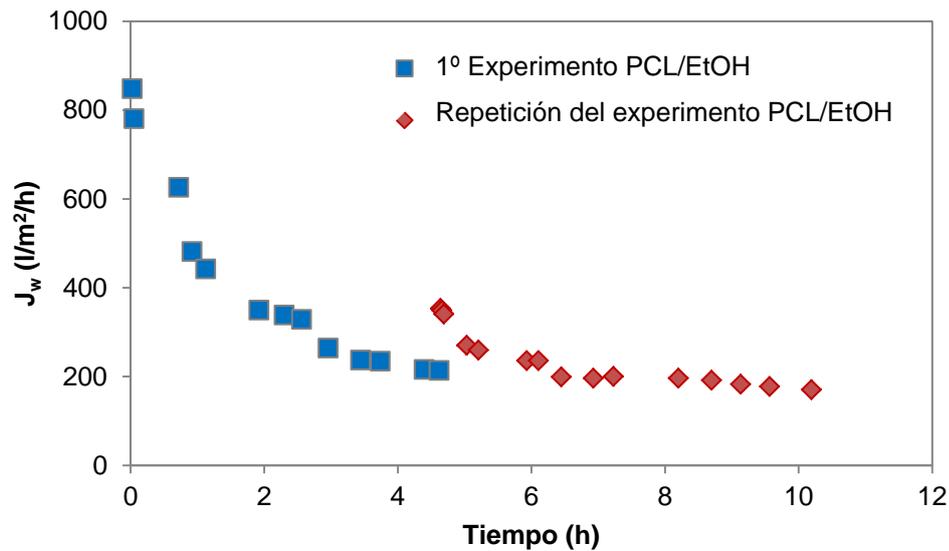


Figura 2.26 Evaluación de flujo de agua UP a lo largo del tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal.

Según la figura 2.26, se puede observar como la repetición del experimento realizado para la caracterización del flujo de agua, da lugar a un flujo inicial relativamente superior al que se había obtenido en el estado estacionario del experimento anterior. Esto podría venir dado por un posible efecto de hinchamiento de las membranas poliméricas, al mantenerse sumergidas en agua UP desde el primer experimento hasta su repetición, y obtenerse una pequeña recuperación de flujo inicial.

En las tablas 2.3 y 2.4 se muestran los valores de flujo obtenidos en el estado estacionario, tanto para la primera medida de flujo, como la repetición de dicho experimento.

Tabla 2.3 Comparativa de los valores de flujo y permeancia de agua en el estado estacionario, entre el primer experimento y su repetición, para el sistema de flujo lineal. * Diferencias significativas entre la primera medida de flujo y su repetición, para PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$.

	J_w (L/m ² /h) 1º Experimento	J_w (L/m ² /h) Repetición
PCL/EtOH	156 ± 58	134 ± 37
PCL/IPA	186 ± 61	77 ± 9

Tabla 2.4 Comparativa de los valores de flujo y permeancia de agua en el estado estacionario, entre el primer experimento y su repetición, para el sistema de flujo lineal. * Diferencias significativas entre la primera medida de flujo y su repetición, para PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 2$.

	J_w (L/m ² /h) 1º Experimento	J_w (L/m ² /h) Repetición
PCL/EtOH	158 ± 7	102 ± 62
PCL/IPA	107 ± 13	83 ± 7

Según las tablas 2.3 y 2.4, se observa que la caída de flujo de agua en el experimento de repetición, es prácticamente despreciable, ya que se obtienen flujo finales similares a los del experimento anterior. No se encontraron diferencias significativas del flujo tras sucesivos usos. Sin embargo, para evaluar de forma más precisa estos resultados, sería necesario repetir más experimentos y evaluar qué ocurre con el soporte con más usos posteriores.

❖ Caracterización de flujo de proteína (BSA)

Estos ensayos consisten en filtrar una disolución de BSA en agua UP (0,4 g/L) a través de las membranas fabricadas. El tiempo de operación fue de aproximadamente 10 horas, bajo una presión transmembranal constante en cada sistema experimental, 0,3 y 0,2 bares, para el sistema de flujo lineal y flujo tangencial, respectivamente.

A continuación, se muestran los resultados más representativos obtenidos para ambos sistemas de configuración de flujo. El resto de resultados se recogen en el ANEXO V.

En estas figuras 2.27 y 2.28, se representan el flujo total adimensional (J_T , $adim$), definido mediante la ecuación 2.10, a lo largo del tiempo, para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de flujo lineal y flujo tangencial, respectivamente.

$J_{T, adim}$ se define como el cociente del flujo total de disolución de BSA (J_T) medido a lo largo del tiempo, entre el flujo total inicial ($J_{T,0}$) que presentaba la muestra, según la siguiente ecuación:

$$J_{T,adim} = \frac{J_T}{J_{T,0}} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

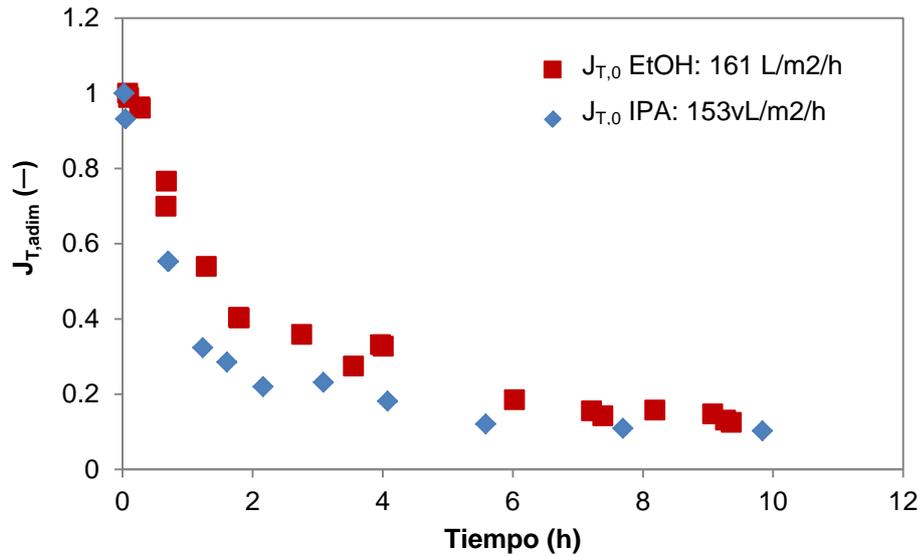


Figura 2.27 Evolución del flujo adimensional total con el tiempo, para la membrana PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

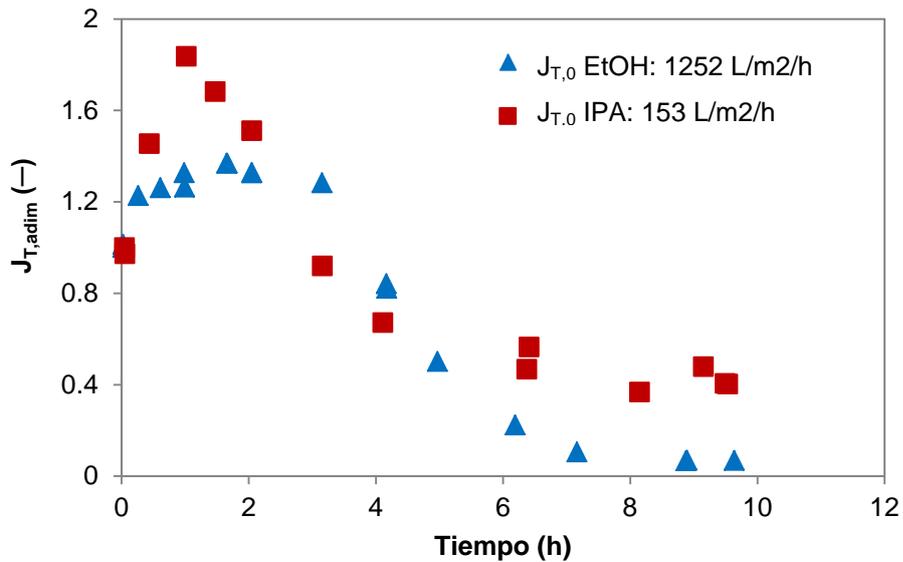


Figura 2.28 Evolución del flujo adimensional total con el tiempo, para la membrana PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial.

Según la figura 2.28, se observa de nuevo la dispersión de $J_{T,0}$, mostrando mayor caída cuanto mayor $J_{T,0}$, como ocurría en la caracterización de flujo de agua. Mientras que cuando $J_{T,0}$ es similar, figura 2.27, presentan caídas de flujo similar.

Por otro lado, en el sistema de flujo tangencial, se observa una subida inicial de flujo, tras una posterior bajada de este a las 2-3 h de experimento. No se conoce por el momento la causa de este fenómeno. Además, el tiempo de estabilización en el sistema lineal y tangencial (en torno a 6-8 h en ambos sistemas), es superior al previamente obtenido en agua (4-5h, 2-3h, respectivamente)

Tras la obtención de estos resultados se estudian los valores finales obtenidos para el estado estacionario. Para ello, se representan en la figura 2.29 la permeancia total, la permeancia de BSA y el rechazo en estado estacionario. Se representan permeancias, en vez de flujos, dado que los experimentos de flujo lineal se llevaron a cabo a una presión diferente de la del sistema de flujo tangencial.

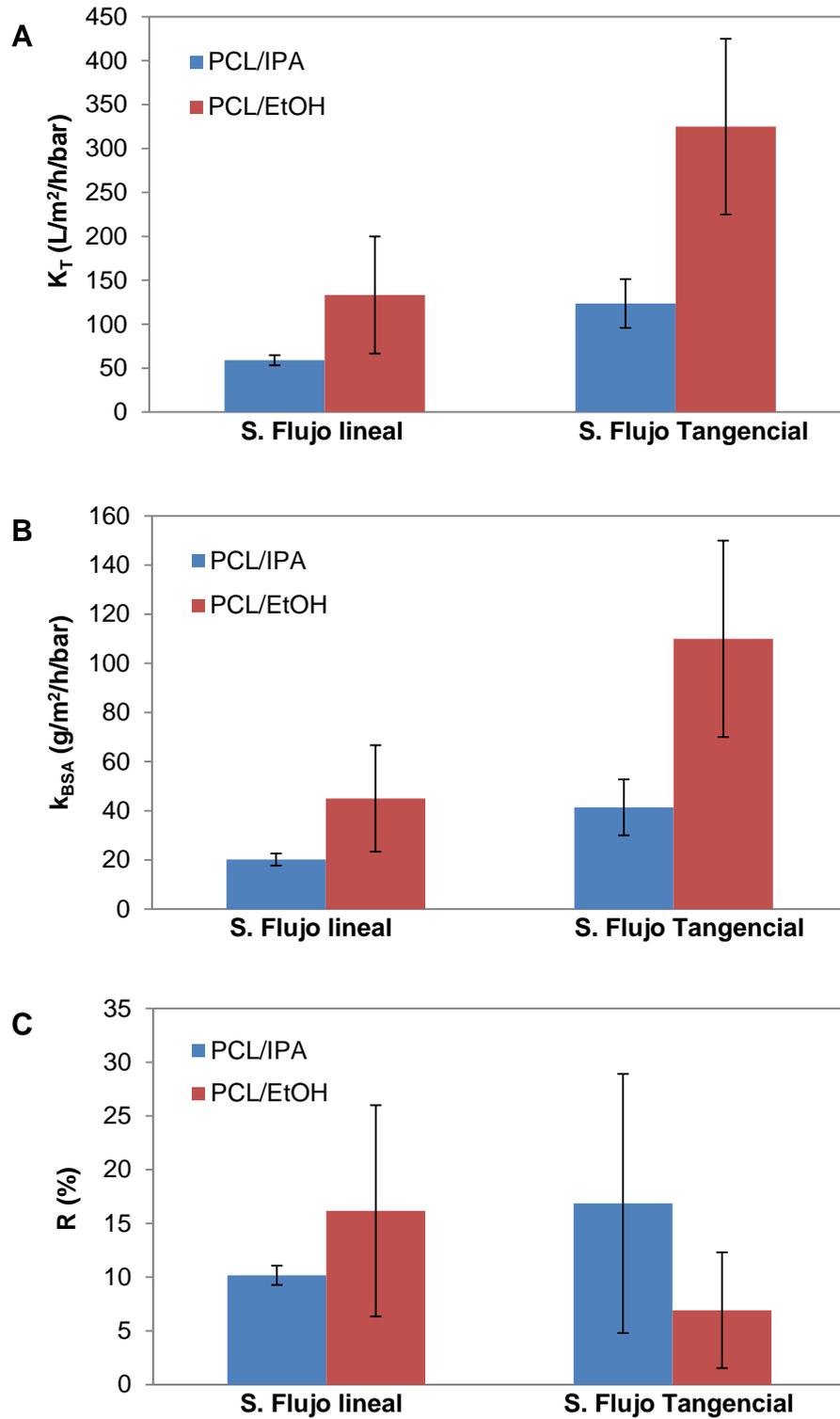


Figura 2.29 Permeabilidad total (A), permeabilidad de BSA (B), y Rechazo (C) en el estado estacionario, de las membranas PCL/EtOH y PCL/IPA, para cada sistema de configuración de flujo.

Según se observa en la figura 2.29, se observan resultados similares entre las membranas, para los diferentes sistemas de configuración, exceptuando PCL/EtOH en el sistema de flujo tangencial, obteniendo valores de K_T y k_{BSA} aparentemente superiores al resto.

En las tablas 2.5 y 2.6, se recogen estos resultados y se compara la permeancia de agua con la permeancia total de disolución de BSA obtenida en estos experimentos, para las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA, en el sistema de flujo lineal y tangencial, respectivamente.

Tabla 2.5 Valores de permeancia de agua (K_w), permeancia total (K_T) y de bsa (k_{BSA}), y rechazo (R), en el sistema de flujo lineal, para una presión constante de 0,3 bar.

	K_w (L/m ² /h/bar)	K_T (L/m ² /h/bar)	k_{BSA} (g/m ² /h/bar)	R (%)
PCL/EtOH	390 ± 145	133 ± 67	45 ± 22	16 ± 10
PCL/ IPA	466 ± 152	59 ± 6	20 ± 2	10 ± 1

Tabla 2.6 Valores de permeancia de agua (K_w), permeancia total (K_T) y de bsa (k_{BSA}), y rechazo (R), en el sistema de flujo tangencial, para una presión constante de 0,2 bar.

	K_w (L/m ² /h/bar)	K_T (L/m ² /h/bar)	k_{BSA} (g/m ² /h/bar)	R (%)
PCL/EtOH	394 ± 16	325 ± 100	110 ± 40	7 ± 5
PCL/ IPA	268 ± 33	123 ± 28	41 ± 11	17 ± 12

La comparativa entre la filtración de agua y de BSA se desarrolla a partir de las permeancias obtenidas en ambos experimentos. Así, a partir de los valores de K_T y K_w de las tablas 2.5 y 2.6, se pueden obtener las siguientes caídas de permeancia, para el sistema de flujo lineal y sistema de flujo tangencial: 66 y 87%; y 17% y 54%, la membrana PCL/EtOH y PCL/IPA, respectivamente.

Se observan caídas de permeancia más importantes en el sistema de flujo lineal, por lo tanto, en este sistema hay una mayor tendencia a que se creen depósitos, y dar lugar a, fenómenos de *fouling*.

Mientras que el sistema de flujo tangencial, presenta menos caída de permeancia en ambas membranas, eliminando los depósitos superficiales de proteína, existiendo además una caída despreciable para la membrana de PCL/EtOH en este sistema, presentando una permeancia total similar a la obtenida para agua.

Además, en el caso de PCL/IPA las caídas son más pronunciadas que las de PCL/EtOH, en los dos sistemas experimentales.

Tras estas observaciones, se puede considerar que la membrana PCL/EtOH presenta depósitos de proteína o fenómenos de *fouling* en la parte superficial de la membrana, el cual, se corrige en el sistema de flujo tangencial, dada la similitud, en este sistema, entre la permeancia total y la permeancia de agua.

Por otro lado, se puede suponer que la membrana de PCL/IPA presenta fenómenos de *fouling* o ensuciamiento interno ya que no se corrige con el sistema de flujo tangencial. El fenómeno de *fouling* de tipo interno, es el que más afecta en el flujo total [32], como se observa para PCL/IPA, cuyas caídas de permeancia son más pronunciadas que para PCL/EtOH, en los dos sistemas experimentales. Además este fenómeno es producido por tamaños de poro superficiales mayores [19], visibles en las imágenes de SEM para PCL/IPA.

En cuanto a los rechazos obtenidos, se mantienen en valores relativamente bajos, entorno 10-15 %, aunque existe una dispersión elevada de este resultado entre las muestras. Esto nos da una idea, de que se introduce la suficiente cantidad de proteína al medio de cultivo. Además, habrá una buena permeabilidad del resto de nutrientes presentes en el medio de cultivo, ya que, presentan tamaños moleculares (50-500 Da) dos 2 órdenes de magnitud menor al tamaño molecular que presentan las proteínas (5000-80000 Da).

Los resultados son preliminares, no se ha realizado el análisis estadístico, debido a que la muestra poblacional era demasiado pequeña ($n=2$) para que fueran concluyentes.

Tras la filtración de BSA a través de las membranas en el sistema de flujo lineal, se realizaron los ensayos de ángulo de contacto dinámico y MLCF, sobre estas muestras ya utilizadas, para evaluar los posibles efectos de *fouling* sobre las membranas. Estas técnicas se desarrollan a continuación.

❖ Microscopía láser confocal (MLCF)

Esta técnica se utilizó para comprobar de forma cualitativa, si existían depósitos de proteína en la superficie de las membranas ya utilizadas en la caracterización de flujo de proteína, en el sistema de flujo lineal.

Las imágenes se pueden observar en la figura 2.30, en donde se representa la superficie de las membranas.

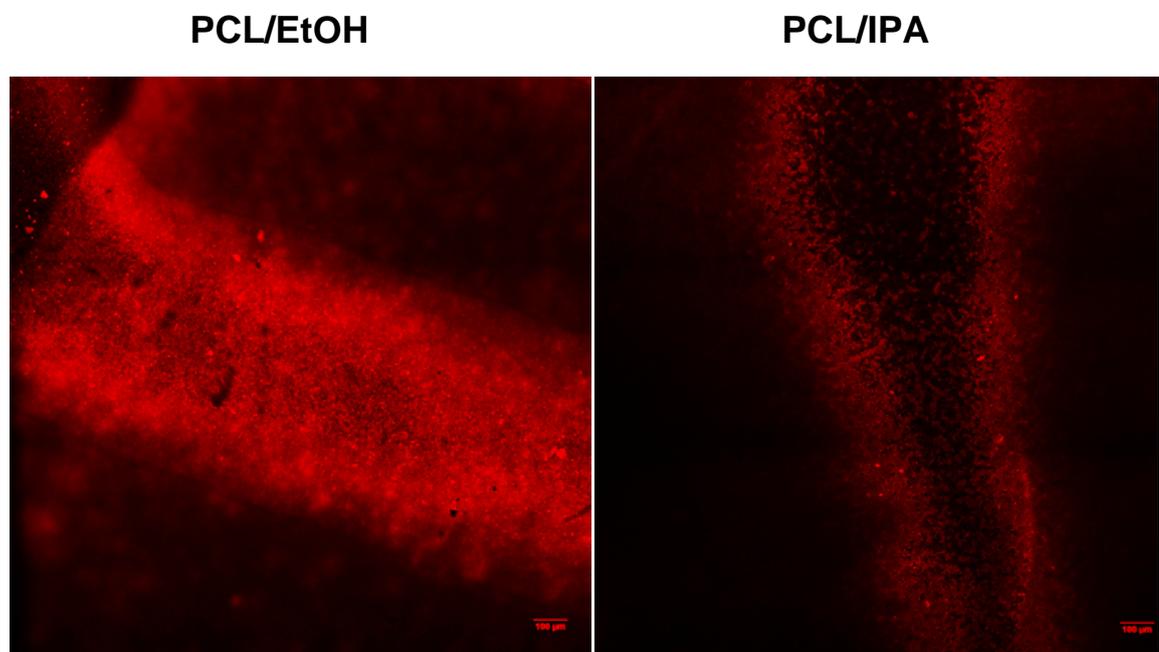


Figura 2.30 Imágenes de membranas PCL/EtOH y PCL/IPA tras la filtración de BSA en flujo lineal.

Tal y como se observa en la figura 2.30, las membranas presentan depósitos de proteína sobre la superficie, además, considerablemente mayor para el caso de PCL/EtOH. Esto muestra relación con las observaciones en la experimentación de filtración de proteínas. La mayor parte de la proteína en las membranas PCL/EtOH se depositan sobre la superficie, originando *fouling* externo. En las membranas de PCL/IPA, en la superficie hay menor cantidad de proteína, quedando la mayor parte retenida en la superficie de los poros, originando *fouling* interno.

❖ **Ángulo de contacto dinámico**

Este ensayo se realizó para cuantificar la existencia de depósitos en la superficie de las membranas. Se realizó sobre dos tipos de muestras: membranas nuevas y muestras ya utilizadas en la caracterización de flujo de proteína, en el sistema de flujo lineal. En la figura 2.31, se muestra el ángulo de contacto en los dos tipos de muestras a lo largo del tiempo, para PCL/EtOH y PCL/IPA, en cada caso.

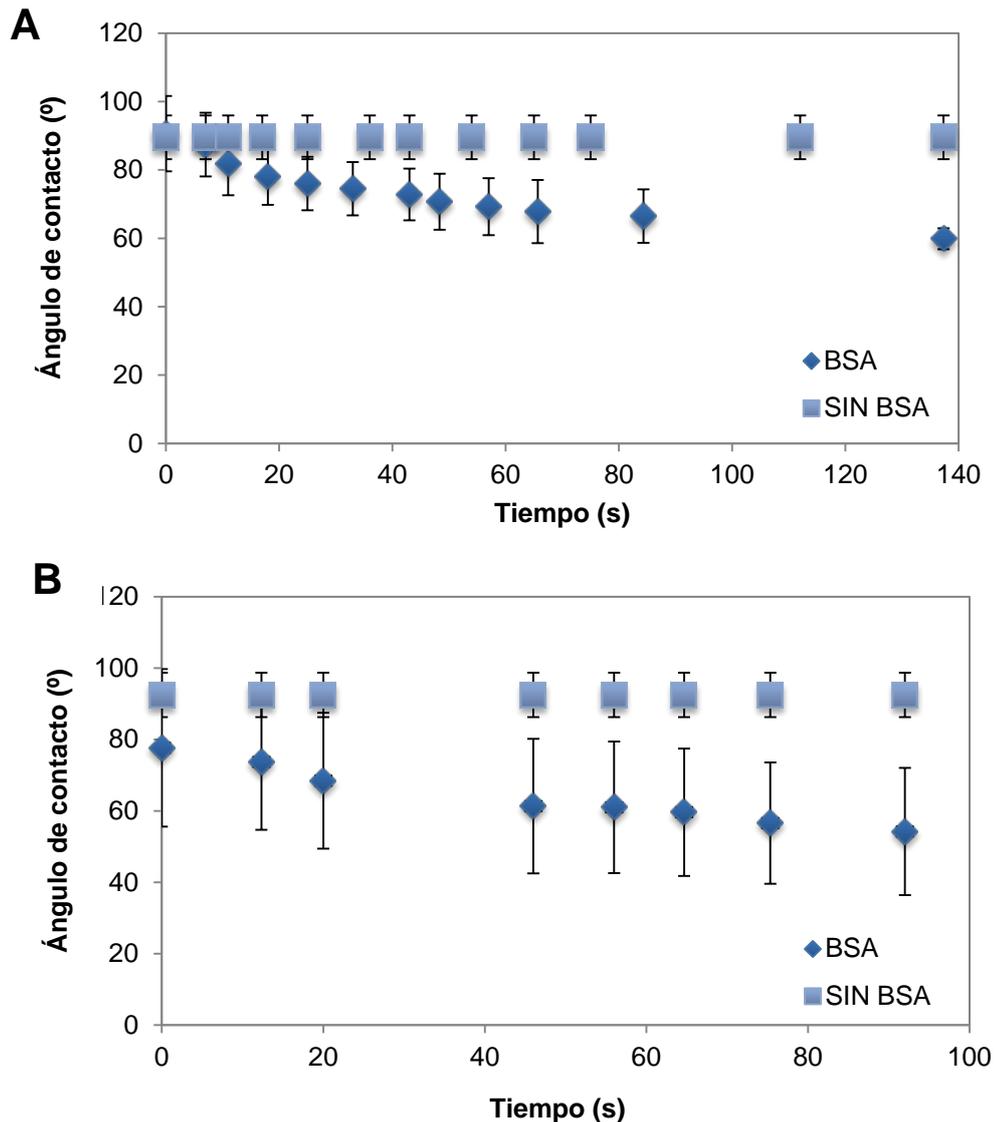


Figura 2.31 Evolución del ángulo de contacto con el tiempo, para las membranas PCL/EtOH (A) y PCL/IPA (B).

Tal y como se observa en las figuras 2.31, el ángulo de contacto de las membranas que han sido anteriormente filtradas con la disolución de BSA, presentan una cierta cantidad de proteína en la superficie, ya que el ángulo disminuye con el tiempo. Además comparando ambas figuras, se observa que las muestras de PCL/EtOH que contenían BSA, presentan cantidades muy similares en la superficie, ya que en ángulo de contacto es similar entre las distintas muestras. Sin embargo, las muestras de PCL/IPA que contenían BSA en la superficie, presentan una mayor dispersión de los resultados, dado que, la superficie de esta membrana presenta mayor

heterogeneidad, y mayor diámetro de poro, haciendo que la deposición de proteína sea más distinta de unas membranas a otras.

En la figura 2.32, se observa el valor final del ángulo de contacto para las muestras nuevas, como para las que estuvieron en contacto con BSA.

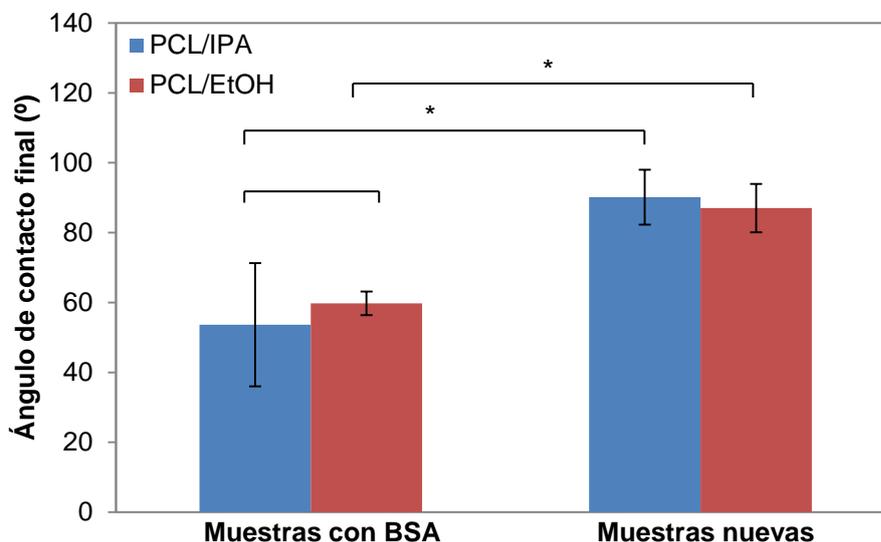


Figura 2.32 Valores del ángulo de contacto al finalizar el experimento. * Diferencias significativas entre el ángulo de contacto de muestras nuevas con las muestras de filtración de BSA analizado para cada membrana, PCL/EtOH y PCL/IPA, de acuerdo al t de Student ($p < 0,05$) $n \geq 3$.

Según se observa en la figura 2.32, existen diferencias significativas entre los valores de ángulo de contacto de las muestras de membrana nuevas, de las que estuvieron en contacto con BSA, 60 ± 3 y 87 ± 7 , para PCL/EtOH y 54 ± 18 y 90 ± 8 , para PCL/IPA, respectivamente.

Además, comparando las muestras en contacto de BSA de PCL/EtOH con PCL/IPA (60 ± 3 , 54 ± 18 , respectivamente), no se observan diferencias significativas, con lo cual en los 2 tipos de membranas existe deposición de proteínas. Teniendo la membrana de PCL/IPA, una mayor dispersión de valores, como se ha explicado anteriormente

Además, esta adsorción del agua originada por proteína depositada en la superficie, ya fue demostrada por Fleischer et al [31], ya que realizaron soportes de BSA, y compararon el ángulo de contacto de estos, con

membranas de PCL y con membranas de PCL tratadas con una disolución de Fibronectina 1% (v/v). En la figura 2.33, se muestran estos resultados, en donde 'Albumin' representa soportes de BSA, 'PCL-' soportes de PCL, y 'PCL+' soportes de PCL tratado Fibronectina.

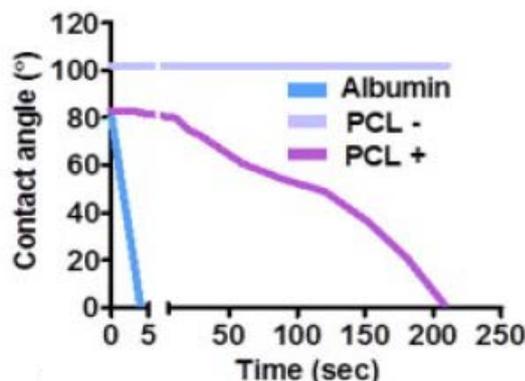


Figura 2.33 Medida del ángulo de contacto para tres tipos de scaffold: albumin, PCL-, PCL+ [31].

Según la figura 2.33, se puede ver como los soportes de BSA presentan una gran capacidad de adsorción del agua. Por otro lado, la membrana de PCL y la membrana de PCL tratada con proteína, presentan el mismo comportamiento que nuestras muestras nuevas y las que estuvieron en contacto con BSA, respectivamente. Dado que el ángulo de contacto de muestras sin estar en contacto con la proteína, presentan ángulo de contacto entre 90-100°, sin embargo, cuando han estado en contacto con proteínas, para un valor de tiempo de 100 s, el ángulo ha descendido a un valor entorno a 60°.

Los resultados obtenidos en la caracterización de las propiedades de transporte de las membranas fabricadas PCL/EtOH y PCL/IPA, se relacionan de forma adecuada con los obtenidos por Wang et al [33], en donde, se lleva a cabo la fabricación de membranas de PCL tubulares de forma similar a nuestro método. Además, analizaron la permeancia obtenida de agua, y nutrientes como glucosa y BSA. Obtuvieron valores de permeancia de agua, entorno a, $6 \cdot 10^{-14}$ m² obtenido a partir de la ley de

Darcy. Comparado con nuestro valor de permeancia en el estado estacionario ($1,5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$), se observan permeabilidades más altas en su caso, debido a diferencias morfológicas, con rangos de diámetro de poro (5-10 μm) mayores que nuestro caso (0,6 μm).

Por otro lado, Wang et al [33], también realizó el estudio comparativo entre la filtración de agua y de BSA. Por ello, tras llevar a cabo la filtración de una disolución de BSA de 1 mg/mL en tampón o buffer fosfato salino (PBS), obtienen una reducción de la permeancia total, del 60-70 %. Esto lo atribuyen a un posible fenómeno de adsorción de esta proteína a la superficie de la membrana. A pesar de que las membranas de PCL/EtOH y PCL/IPA presenten permeancias más bajas que Wang et al [33], en dos órdenes de magnitud, nuestras membranas sufren una similar caída de la permeancia, en un rango de 54-87% de caída de permeancia, corroborando así el comportamiento obtenido por filtración de BSA, y la posible adsorción o ensuciamiento en las membranas, dado por esta molécula.

2.2.3 Adsorción de proteínas (BSA)

La adsorción de proteínas adquiere una importante atención para el fin de las membranas fabricadas en este proyecto, dado que, una pequeña cantidad de proteína adsorbida sobre la superficie permite una adecuada adherencia de células, y además en el caso de la proteína BSA, es indispensable para que se produzca la proliferación celular.

En este ensayo se evaluó la adsorción de la proteína BSA sobre las membranas anteriormente fabricadas, PCL/EtOH y PCL/IPA, mediante el contacto estático de las muestras con la disolución de proteína, tal y como se ha explicado en la sección 2.1.4. En la figura 2.34 se representan las cantidades de BSA adsorbida en la superficie de las membranas PCL/EtOH y PCL/IPA.

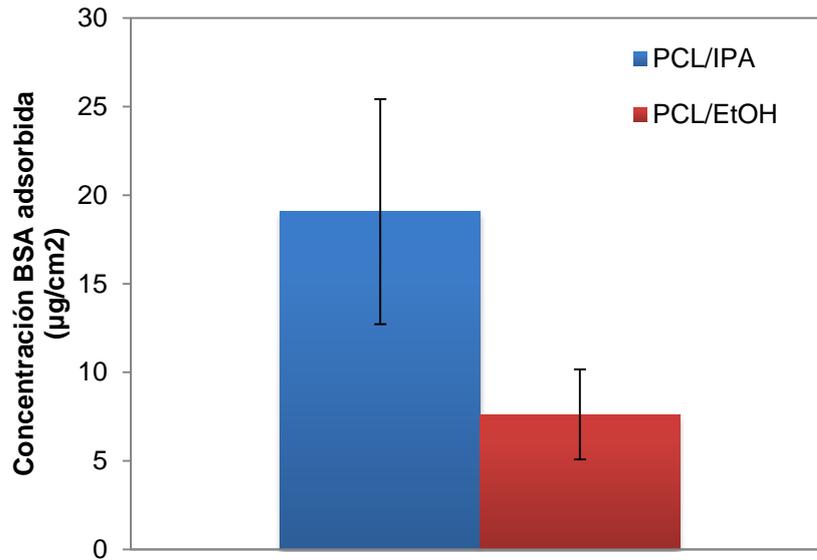


Figura 2.34 Cantidad de BSA adsorbida en las membranas PCL/IPA y PCL/EtOH.

Según se observa en la figura 2.34, la cantidad de proteína que puede quedar adsorbida, es ligeramente mayor en las membranas de PCL/IPA que en el caso de PCL/EtOH, con valores de 19 ± 6 y 8 ± 6 , respectivamente. Este hecho puede estar relacionado con las características morfológicas de la superficie de la membrana de PCL/IPA, ya que al tener mayor poro superficial el acceso al interior de los poros es mayor. Mientras que en el caso de PLC/EtOH, esta adsorción se produce en mayor medida en la superficie, ya que el tamaño de poro inferior, no permite tanto acceso al interior. No se realizaron análisis estadísticos en este caso, por la escasa muestra ($n=2$) poblacional.

Por otro lado, esta adsorción también está relacionada con el carácter hidrófobo que muestran las superficies, ya que se produce una interacción entre las proteínas sobre con tipo de superficies.

En la tabla 2.7 se comparan los resultados de adsorción obtenidos para estas membranas con resultados de la literatura, para otros tipos de membranas.

Tabla 2.7 Comparativa de adsorción de BSA con otros trabajos, para distintas membranas poliméricas, tanto de PCL, como otros materiales poliméricos.

Material del Scaffold	Concentración de la disolución de BSA (g/L)	Cantidad proteína adsorbida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PCL/IPA (este trabajo)	0,4	19 \pm 6
PCL/EtOH (este trabajo)	0,4	8 \pm 3
PCL [34]	4,5	0,5 \pm 0,032
Polisulfona (PSF) [35]	0,4	2,7 \pm 0,2
Acetato de polivinilo (PVA) [36]	0,4	35
Película porosa de fibroína de seda (PSFFs) [36]	0,4	7,35

Según la tabla 2.7, se observa que los valores de adsorción de BSA para las membranas fabricadas en este trabajo, se encuentran dentro del rango de valores obtenidos en la literatura. Comparando con los resultados obtenidos por Ye et al [34], se observa que a pesar de usar el mismo polímero, los valores de adsorción de BSA para sus membranas, son menores que en nuestro caso. Esto puede ser debido, a la diferencia entre los métodos de fabricación utilizados, ya que realizan membranas de PCL mediante electrospinning con fibras de 2mm de diámetro, por tanto, alta superficie efectiva accesible para el contacto o adsorción de BSA.

Por otro lado, la adsorción de proteínas de la PSF es analizada por Ishihara et al [35]. Pese a tener estas membranas, un método de fabricación y un carácter hidrofóbico similar a las membranas fabricadas en este trabajo, la cantidad de proteína adsorbida es menor que en nuestro caso, al tratarse de polímeros distintos.

Finalmente, Ziling et al [36], estudian la adsorción de proteínas de PSFFs, y su comparación con membranas de PVA. Observaron valores similares de adsorción a los de este trabajo, y además, realizaron estudios *in-vivo* con la membrana de PSFFs, y concluyeron que había una buena compatibilidad, y no se producían limitaciones entre el soporte y el tejido.

Asociados a estos resultados, la biocompatibilidad y la adherencia celular sobre estos soportes, será evaluado a continuación, para PCL/EtOH y PCL/IPA.

2.2.4 Viabilidad del cultivo celular

Los ensayos de cultivo celular se desarrollan en estatico, durante 24 h, a partir de la línea celular de glioblastoma humano U87 (ATCC HTB 14), pertenecientes al tejido cerebral humano.

El análisis y evaluación de la biocompatibilidad y adherencia del cultivo celular, se realiza a partir de las imágenes obtenidas por la técnica de microscopia confocal y SEM figura 2.36 y 2.37, respectivamente.

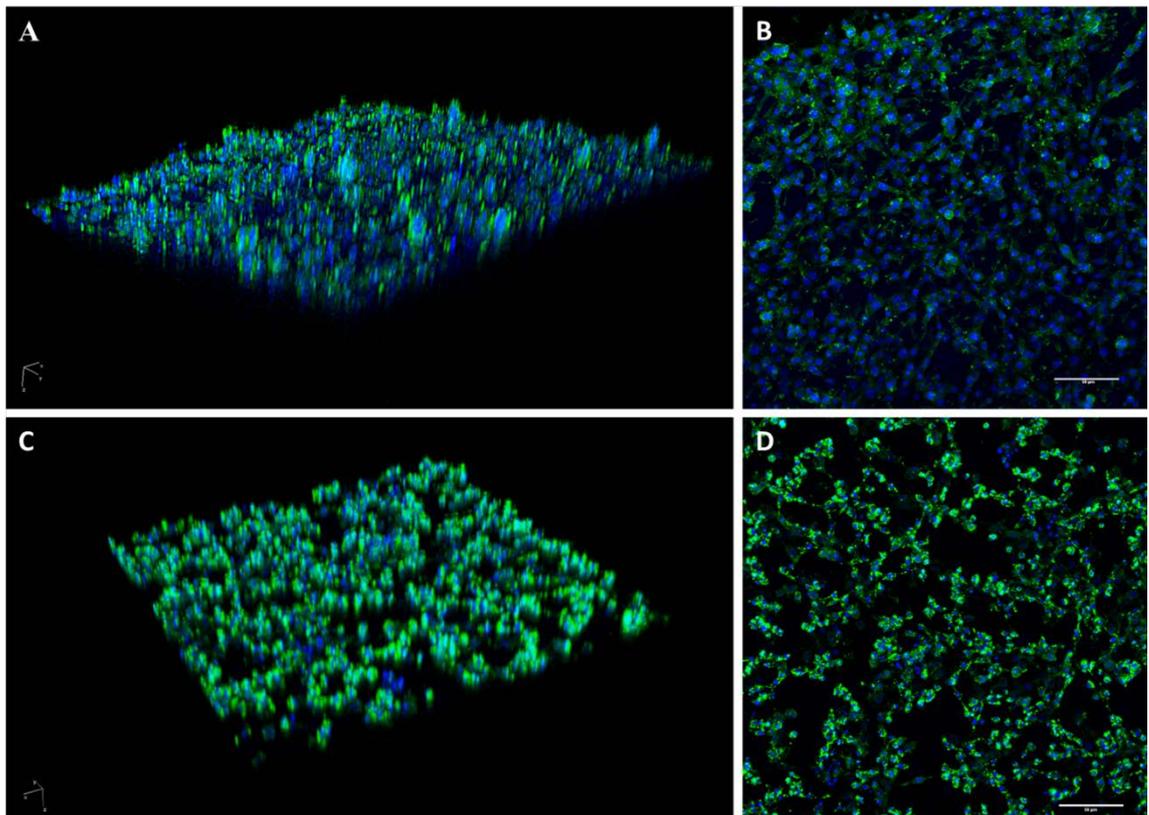


Figura 2.35 Imágenes de confocal tridimensionales (A y C) y superficiales (B y D) para el cultivo celular de glioblastoma humano tras 48 h. Las imágenes A y B corresponden a PCL/EtOH, y C y D, a PCL/IPA. Todos los núcleos se representan en azul, y la arquitectura del citoesqueleto de actina, en verde. Magnificación original x200. Las barras indican 50 μm .

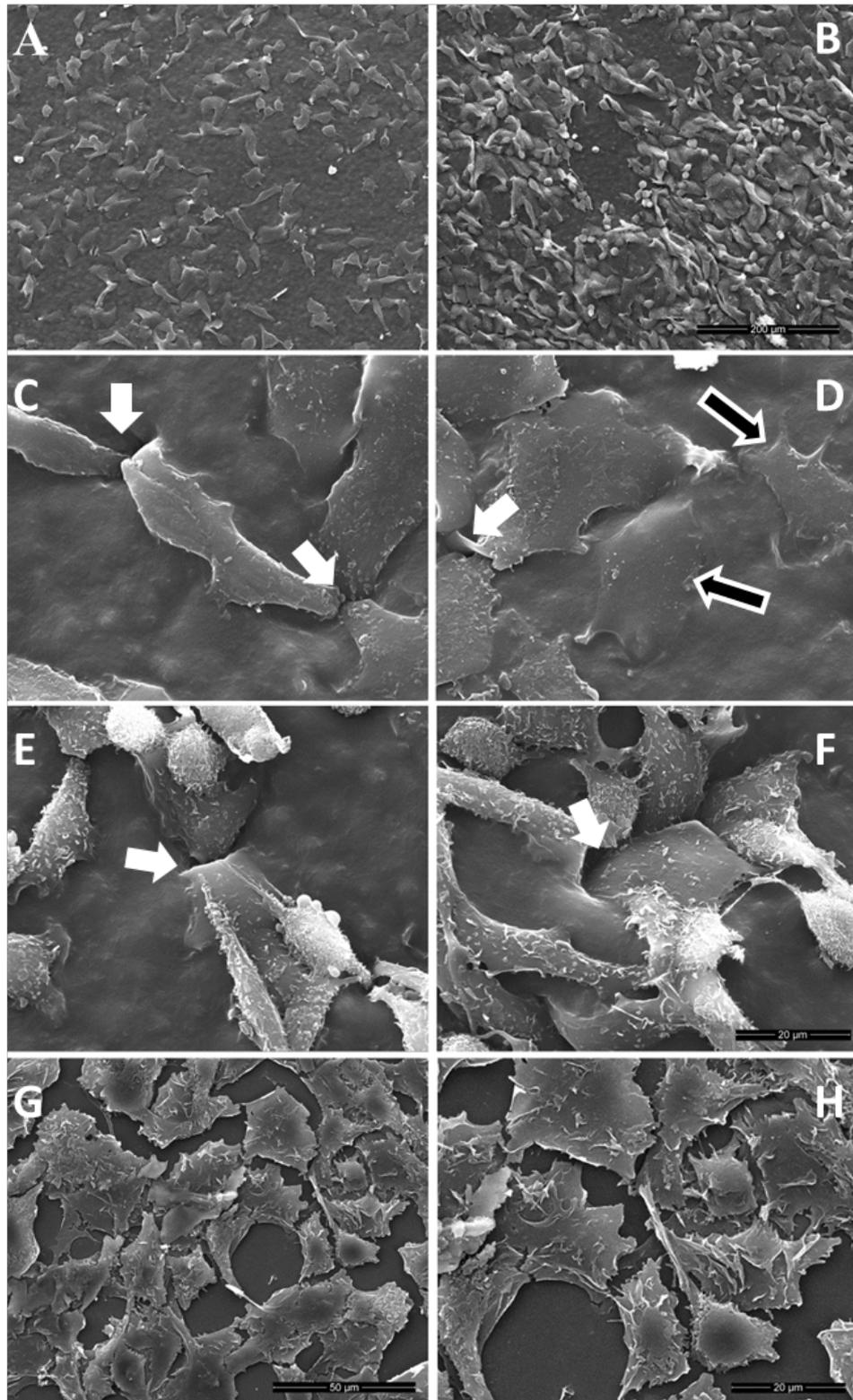


Figura 2.36 Imágenes de SEM de la adhesión y crecimiento de células neuronales en el soporte de PCL/EtOH (A, C y D) y en de PCL/IPA (B, E y F) tras 48 h de cultivo celular. La barra de escala para A y B es de 200 µm, y para C, D, E y F, es de 20 µm. G y H representan imágenes de control de morfología y adhesión celular de glioblastoma U87 tras 48 h en matraz de plástico (barra de escala de G 50 µm, y de H, 20 µm).

Tal y como se observa en la figura 2.36 y figura 2.37 (A y B), se obtiene una alta densidad de células neuronales con una distribución uniforme y homogénea en los dos tipos de soportes. Por tanto, esto indica que el método de cultivo es eficaz para conseguir la proliferación uniforme en los soportes fabricados.

La adhesión y morfología celular obtenida son similares a los observados en el sistema de cultivo celular de control (figura 2.37 G). Comparando las imágenes C, D, E y F de la figura 2.37, se observa que la infiltración de las células dentro de los poros del soporte (flechas blancas) es similar a las que muestras células del tejido cerebral observada en cultivos *ex vivo* [37]. Además, según se observa en la figura 2.37 D, los contornos de las células (flechas negras) desaparecen con la superficie del soporte de PCL/EtOH. Además este fenómeno de fusión aparente entre las células y la superficie explica por una lado, la menor densidad celular en la superficie de los soportes de PCL/EtOH (figura 2.37 A), y además, el resultado obtenido de microscopía confocal (figura 2.36 B), dado que este desvanecimiento de las células, podría hacer que el citoesqueleto sea menos accesible para la tinción (color verde) en contraste con el azul de alta densidad de los núcleos.

En la figura 2.38, se muestran los resultados obtenidos tras la tinción de las células mediante MitoTracker. MitoTracker es un indicador fluorescente que se acumula fácilmente en la mitocondria viables, pero en menor grado en las mitocondrias con membranas despolarizadas.

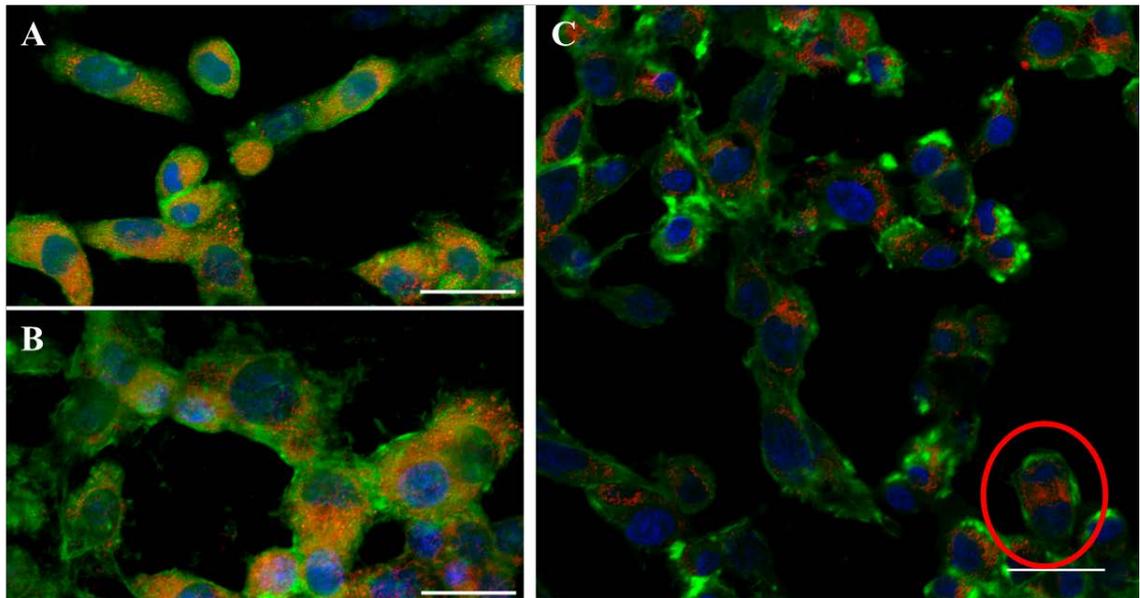


Figura 2.37 Imágenes de confocal del cultivo celular de glioblastoma humano tras 48h con marcador Mito Tracker para la evaluación de la viabilidad mitocondrial. Los núcleos se representan en azul, la arquitectura del citoesqueleto de actina, en verde, y las mitocondrias en rojo. Las imágenes A y B corresponden a PCL/EtOH, y la imagen C a PCL/IPA. El círculo rojo muestra células durante la división. Barra de escala es de 10 μm .

La señal fluorescente observada en la figura 2.38, muestra una distribución de mitocondrias normal por todo el citoplasma, que se relaciona bien con las células viables. En la figura 2.38 C, las células neuronales adheridas sobre la superficie de los soportes de PCL/IPA, todavía presentan fenómenos de división celular tras 48h de cultivo. Por lo tanto, se puede considerar que las membranas son biocompatibles y poseen buenas propiedades para facilitar y fomentar la adherencia celular, en su aplicación como soportes de crecimiento celular en la regeneración de tejidos.

3. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

3. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

En este proyecto se ha desarrollado el estudio y análisis de las propiedades de transporte de membranas planas, fabricadas mediante inversión de fases a partir de poli- ϵ -caprolactona.

Para comenzar el estudio se debía comprobar la reproducibilidad tanto de las características físicas como los valores de permeancia obtenidos en anteriores trabajos.

En cuanto a la caracterización física de los dos tipos de membrana fabricadas, se observan membranas porosas, simétricas con una estructura y morfología similar. Sin embargo, existen diferencias en las superficies de las membranas. PCL/IPA presenta un tamaño de poro superior que PCL/EtOH, y pequeños glóbulos. Mientras que PCL/EtOH presenta estructuras superficiales en forma de escamas. Con los resultados obtenidos se comprobó la reproducibilidad de la fabricación de estas membranas en cuanto a los factores estructurales y morfológicos.

La caracterización de las propiedades de transporte de las membranas fabricadas en el presenta trabajo, muestran una disminución progresiva de los flujos y de la permeancia de agua a lo largo del tiempo de operación hasta alcanzar el estado estacionario en el que se llegaban a valores de flujo similares para los dos tipos de configuración de flujo empleados (lineal y tangencial) y para ambas membranas, PCL/EtOH y PCL/IPA (156 ± 58 y 186 ± 61 , y 158 ± 7 y 107 ± 13 L m⁻²h⁻¹, respectivamente). Además, se encontraron valores de permeancia en el estado estacionario (390 ± 145 y 466 ± 152 , y 394 ± 16 y 268 ± 33 L m⁻²h⁻¹ bar⁻¹, respectivamente) de un orden de magnitud menor que los obtenidos en el anterior trabajo (5277 ± 906 y 6745 ± 1962 L m⁻²h⁻¹ bar⁻¹, PCL/EtOH y PCL/IPA, respectivamente) [25]. Esto se ha atribuido a una compresión/compactación de las membranas al estar sometidas a presión y ser un material de elevada elasticidad y alta porosidad.

Por otro lado, analizando las propiedades de transporte de nutrientes, en este caso, de BSA, se observa que hay una influencia de esta proteína sobre la permeancia total de las membranas:

- Las membranas PCL/ETOH presentan fenómeno de fouling sobre todo superficial que se ve mejorado cuando se trabaja en un sistema de flujo tangencial.
- La membrana de PCL/IPA, presenta un fouling a priori no reversible con el cambio de configuración ya que se atribuye a una penetración de la proteína en el interior poroso de la membrana.
- Los valores de rechazo del 10-15% indican buenas propiedades de transporte de nutrientes.

Los niveles de adsorción de BSA también son indicativos de buenas propiedades de afinidad entre el substrato o membrana y las células. Esto se demostró estudiando la viabilidad de la potencial aplicación de estas membranas como soporte del sistema nervioso central fue evaluada en un sistema de cultivo de glioblastoma humano durante 48 h, obteniéndose elevados valores de densidad celular, con una homogénea distribución a través de los dos tipos de soportes. Sin embargo, sería necesario evaluar estos experimentos durante más largo tiempo y comprobar que no existen efectos significativos de la morfología de cada membrana sobre las respuestas de las células neuronales.

Finalmente, se propone realizar más experimentos de caracterización de flujo de nutrientes, para corroborar y analizar, las suposiciones acerca del posible *fouling* o ensuciamiento originado en las membranas, además de mayor numero de muestras por población para mejorar los análisis estadísticos. Otro estudio importante, es la biodegradabilidad de las membranas, dado que, la degradación juega un papel importante en IT, afectando a la viabilidad y crecimiento celular e incluso a la respuesta del paciente [38].

Por último, realizar cultivos en dinámico para seleccionar la membrana con mayor rendimiento, para finalmente, diseñar un biorreactor en donde será implantada para la producción de tejido neuronal.

4. BIBLIOGRAFÍA

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] PAPPENBURG, B. 2009. Design strategies for tissue engineering scaffolds. PhD thesis, University of Twente, Holanda.
- [2] STOCK, U; VACANTI, J. 2001. Tissue engineering: Current State and Prospects. *Annual Review of Medicine*, **52**, pp. 443-451.
- [3] IKADA, Y. 2006. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*. **3** (10), pp. 589-601.
- [4] GRIFFITH, L; NAUGHTON, G. 2002. Tissue Engineering. Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*. **295**, pp. 1009-1014.
- [5] KOROSSIS, S.A; BOLLAND, F; KEARNEY, J.N; FISHER, J; INGHAM, E. 2005. Bioreactors in Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering*, **2**.
- [6] SALEHI-NIK, N; AMOABEDINY, G; POURAN, B; TABESH, H; ALI SHOKRGOZAR, M.A; HAGHIGHIPOUR, N; KHATIBI, N; ANISI, F; MOTTAGHY, K.; ZANDIEH-DOULABI B. 2013. Engineering parameters in bioreactor's design: a critical aspect in tissue engineering. *Biomed Research International*, **1** (9).
- "
- [7] PÖRTNER, R; NAGEL-HEYER, S; GOEPFERT, C; ADAMIETZ, P; MEENEN, N.M. 2005. Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100** (3), pp. 235-245.
- [8] STAMATIALLIS, D.F; PAPPENBURG, B.J; GIRONÉS, M;SAIFUL, S; BETTAHALLI, S; SCHMITMEIER, S; WESSLING, M. 2007. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, **308** (1-2), pp. 1–34.

- [9] CULTEK. Soluciones cultivos celulares. Protocolos y técnicas. [Consulta: 20 agosto 2014]. Disponible en: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-cultivos_celulares-protocolos.pdf
- [10] CASTROS, P; ISON, A.P; HAYTER, P.M; BULL, A.T. CHO cell growth and recombinant Interferon- γ production: Effects of BSA Pluronic and lipids. 19 (1), pp.27-36.
- [11] KARANDE, T; ONG, J; MAULI AGRAWAL, C. Diffusion in Musculoskeletal Tissue Engineering Scaffolds: Design Issues Related to Porosity, Permeability, Architecture, and Nutrient Mixing. *Biomedical Engineering*, **32** (12), pp. 1728-1743.
- [12] KANG, T; HONG, J.M; JUNG, J.W; YOO, J.J; CHO, D.W. 2013. Design and Assessment of a Microfluidic Network System for Oxygen Transport in Engineered Tissue. *Langmuir*, **29** (2), pp. 701-709.
- [13] NAKAMURA, K; MATSUMOTO; K. 1998. Adsorption behavior of BSA in microfiltration with porous glass membrane. *Journal of Membrane Science*, **145** (1), pp. 119-128.
- [14] TSANG, VL; BHATIA, SN. 2004. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56** (11), pp. 1635-1647.
- [15] KELLY, ST; ZYDNEY, AL. 1995. Mechanisms for BSA fouling during microfiltration. *Journal of Membrane Science*, **107** (1-2), pp. 115-127.
- [16] YE; L; WU, X; DUAN, H; GENG, X; CHEN, B; GU, Y; ZHANG, A; ZHANG, J; FENG, Z. 2012. The *in vitro* and *in vivo* biocompatibility evaluation of heparin-poly(ϵ -caprolactone) conjugate for vascular tissue engineering scaffolds. *Society for Biomaterials*, **100A** (12), pp. 3251-3258.

- [17] CUSHNIE, E.K; KHAN, Y.M; LAURENCIN C.T. 2010. Tissue-engineered matrices as functional delivery systems: Adsorption and release of bioactive proteins from degradable composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research (Part A)*, **94A** (2), pp. 568-575.
- [18] NAKAMURA, K; MATSUMOTO, K. 2006. Properties of protein adsorption onto pore surface during microfiltration: Effects of solution environment and membrane hydrophobicity. *Journal of Membrane Science*. **280**, pp.363-374.
- [19] SUN, S; YUE, Y; HUANG, X; MENG, D. 2003. Protein adsorption on blood-contact membranes. *Journal of Membrane Science*. **222** (1-2), pp.3-18.
- [20] BENGOCHEA CUADRADO, C. 2013. *Fabricación de membranas poliméricas biodegradables mediante inversión de fases para aplicación en ingeniería de tejidos*. DIBAN, N. (dir.). Proyecto Fin de Carrera, Universidad de Cantabria.
- [21] DIBAN, N; RAMOS-VIVAS, J; REMUZGO-MARTINEZ, S; ORTIZ, I; URTIAGA, A. 2014. Poly(ϵ -caprolactone) films with favorable properties for neural cell growth. *Current topics in Medicinal Chemistry* (Aceptado)
- [22] ALSALHY, Q; MERZA, A; RASHID, K; ADAM, A; FIGOLI, A; SIMONE, S; DRIOLI, E. 2013. Preparation and characterization of poly(vinyl chloride)/polystyrene/poly(ethylene glycol) hollow-fiber ultrafiltration membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, **130** (2), pp. 989-1004.
- [23] SOTTO DIAZ, A. 2008. *Aplicación de la tecnología de membranas de nanofiltración y ósmosis inversa para el tratamiento de disoluciones acuosas de compuestos fenólicos y ácidos carboxílicos*. María José López Muñoz y Jesús María Arsuaga Ferreras (directores). Tesis doctoral, Universidad Rey Juan Carlos.

- [24] NAKAMURA, K; MATSUMOTO, K. 2006. Properties of protein adsorption onto pore surface during microfiltration: Effects of solution environment and membrane hydrophobicity. *Journal of Membrane Science*. **280**, pp.363-374.
- [25] ISHIIHARA, K; FUKUMOTO, K; IWASAKI, Y; NAKABAYASHI, N. 1999. Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 1. Surface characterization. *Biomaterials*, **20** (17), pp. 1545-1551.
- [26] DOIG, S.D; BOAM, A.T; LIVINGSTON, A.G; STUCKEY, D.C. 1999. Mass transfer of hydrophobic solutes in solvent swollen silicone rubber membranes. *Journal of Membrane Science*, 154 (1), pp. 127-140.
- [27] KARANDE, T.S; ONG, J.L; MAULI, C. 2004. Diffusion in Musculoskeletal Tissue Engineering Scaffold: Design Issues Related to Porosity, Permeability, Architecture, and Nutrient Mixing. *Annals of Biomedical Engineering*, **32** (12), pp.1728-1743.
- [28] KARANDE, T; ONG, J; MAULI AGRAWAL, C. Diffusion in Musculoskeletal Tissue Engineering Scaffolds: Design Issues Related to Porosity, Permeability, Architecture, and Nutrient Mixing. *Biomedical Engineering*, **32** (12), pp. 1728-1743.
- [29] DIBAN, N; STAMATIALLIS, D.F. 2011. Functional Polymer Scaffolds for Blood Vessel Tissue Engineering. *Macromolecular Symposia*, **309-310** (1), pp. 93-98
- [30] MORELLI, S; PISCIONERI, A; MESSINA, A; SALERNO, S; ALFAGEEH, M.B; DRIOLI, E; DE BARTOLO, L. 2012. Neuronal growth and differentiation on biodegradable membranes. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.

- [31] FLEISCHER, S; SHAPIRA, A; OMRI, R; NSEIR, N; ZUSSMAN, E; DVIR, T. 2014. Albumin Fiber Scaffolds for Engineering Functional Cardiac Tissues. *Biotechnology and Bioengineering*, **111** (6), pp.1246-1257.
- [32] KELLY, ST; ZYDNEY, AL. 1995. Mechanisms for BSA fouling during microfiltration. *Journal of Membrane Science*, **107** (1-2), pp. 115-127.
- [33] WANG, Y; TOMLINS, P.E; COOMBES, G.A; RIDES, M. 2010. On the Determination of Darcy Permeability Coefficients for a Microporous Tissue Scaffold. *Tissue engineering*, **16** (2), pp.281-289.
- [34] YE, L; WU, X; DUAN, H; GENG, X; CHEN, B; GU, Y; ZHANG, A; ZHANG, J; FENG, Z. 2012. The *in vitro* and *in vivo* biocompatibility evaluation of heparin-poly(ϵ -caprolactone) conjugate for vascular tissue engineering scaffolds. *Society for Biomaterials*, **100A** (12), pp. 3251-3258.
- [35] ISHIHARA, K; FUKUMOTO, K; IWASAKI, Y; NAKABAYASHI, N. 1999. Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 2. Protein adsorption and platelet adhesion. *Biomaterials*, **20** (17), pp. 1553-1559.
- [36] ZILING, S; LUN, B; GUOPING, G; KUIHUA, Z; HONGQIN, D. 2009. Protein Adsorption and Biocompatibility of Porous Silk Fibroin Films. *Biomedical Engineering and Informatics, 2009. BMEI '09. 2nd International Conference on*.
- [37] REMUZGO-MARTÍNEZ, S.; PILARES-ORTEGA, L.; ICARDO, J. M.; VALDIZÁN, E. M.; VARGAS, V. I.; PAZOS, A.; RAMOS-VIVAS, J. Microglial activation and expression of immune-related genes in a rat *ex vivo* nervous system model after infection with *Listeria monocytogenes*. *Glia*. **2013**, *61*, 611-622.

- [38] WU, L; DING, J. 2004. In vitro of three-dimensional porous poly (*D,L*-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 25 (27), pp. 5821-5830.

5. ANEXOS

5. ANEXOS

ANEXO I. Nomenclatura del proyecto

C_P	Concentración de BSA (g l^{-1}) en el permeado
C_T	Concentración de BSA (g l^{-1}) en el tanque de alimentación
d_{\max}	Diámetro de poro máximo (μm)
d_{\min}	Diámetro de poro mínimo (μm)
d_p	Diámetro de poro medio (μm)
FC	Factor de caída de flujo
J_{BSA}	Flujo de bsa en el permeado ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
J_T	Flujo total de permeado, en experimentos de BSA ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
$J_{T,adim}$	Flujo total de permeado, en experimentos de BSA ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
$J_{T,0}$	Flujo total inicial del permeado, en experimentos de BSA ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
J_w	Flujo de agua del permeado ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
$J_{w,adim}$	Flujo de agua del permeado ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
$J_{w,0}$	Flujo inicial de agua del permeado ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)
k_{BSA}	Permeancia de BSA ($\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$)
K_T	Permeancia total, en experimentos de BSA ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$)
K_w	Permeancia de agua de la membrana ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$)
R	Rechazo de BSA de la membrana (%)
W_1	Peso de membrana húmeda (g)
W_2	Peso de membrana mojada (g)
ΔP	Presión transmembranal (bar)

Simbología griega

γ	Tensión interfacial (N/m)
δ	Espesor de membrana (μm)
ε_m	Porosidad media de los dos disolventes (%)
ε_k	Porosidad mediante queroseno (%)
ε_i	Porosidad mediante iso-propanol (%)
θ	Ángulo de contacto ($^\circ$)
ρ_d	Densidad de disolvente (g cm^{-3})
ρ_p	Densidad de la PCL (g cm^{-3})

ANEXO II. Composición medio de cultivo 'Advanced DMEM'.

Advanced DMEM (12492) GIBCO			
Components	Molecular Weight (Da)	Concentration (mg/L)	mM
AMINO ACIDS			
Glycine	75	37.5	0.1
L-Alanine	89	8.9	Infinity
L-Arginine hydrochloride	211	84	Infinity
L-Asparagine	150	13.2	Infinity
L-Aspartic acid	133	13.3	Infinity
L-Cystine 2HCl	313	63	Infinity
L-Glutamic Acid	147	14.7	Infinity
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	210	42	Infinity
L-Isoleucine	131	105	Infinity
L-Leucine	131	105	Infinity
L-Lysine hydrochloride	183	146	Infinity
L-Methionine	149	30	Infinity
L-Phenylalanine	165	66	Infinity
L-Proline	115	11.5	Infinity
L-Serine	105	52.5	Infinity
L-Threonine	119	95	Infinity
L-Tryptophan	204	16	Infinity
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261	104	Infinity
L-Valine	117	94	Infinity
VITAMINS			
Ascorbic Acid phosphate	289.54	2.5	Infinity
Choline chloride	140	4	Infinity
D-Calcium pantothenate	477	4	0.0021
Folic Acid	441	4	0.0023
Niacinamide		4	Infinity
Pyridoxine hydrochloride	206	4	Infinity
Riboflavin	376	0.4	Infinity
Thiamine hydrochloride	337	4	Infinity
i-Inositol	180	7.2	Infinity
INORGANIC SALTS			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200	1.801
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	0.1	Infinity
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	Infinity
Potassium Chloride (KCl)	75	400	Infinity
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84	3700	Infinity
Sodium Chloride (NaCl)	58.44	6400	
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O)	159.97	125	Infinity
PROTEINS			
AlbuMAX® II	67000	400	Infinity
Human Transferrin (Holo)	80000	7.5	Infinity
Insulin Recombinant Full Chain	5810	10	Infinity
TRACE ELEMENTS			
Ammonium Metavanadate	116.98	3.00E-04	Infinity
Cupric Sulfate	159.61	0.00125	Infinity
Manganous Chloride	198	5.00E-05	Infinity
Sodium Selenite	173	0.005	Infinity
OTHER COMPONENTS			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	Infinity
Ethanolamine	97.54	1.9	Infinity
Glutathione (reduced)	307	1	0.0033
Phenol Red	376.4	15	Infinity
Sodium Pyruvate	110	110	Infinity

ANEXO III. Resultados Porometría de flujo capilar

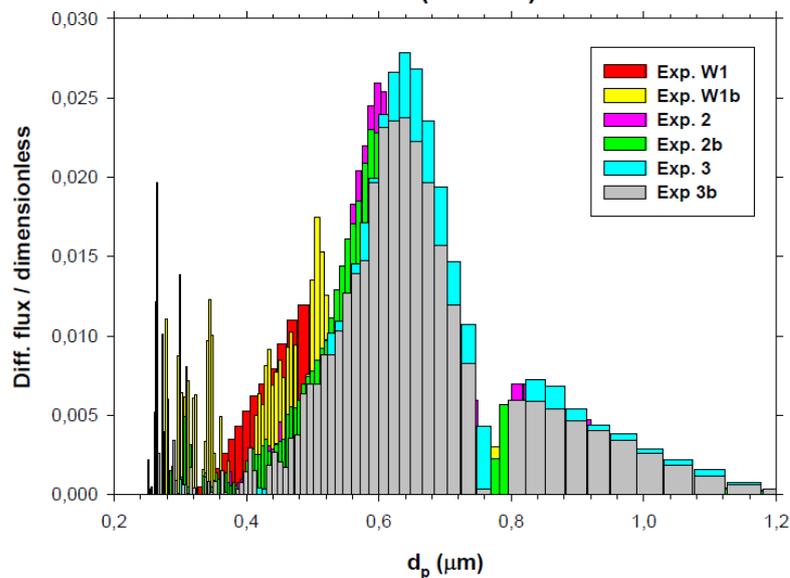


Figura 5.1 Distribución de tamaño de poro a lo largo de WET RUN y DRY RUN, para todas las muestras de la membrana PCL/EtOH, mediante porometría de flujo capilar

Tabla 5.1 Valores de diámetro mínimo, máximo y medio (d_p) obtenido a para todas las muestras de PCL/IPA mediante porometría de flujo capilar

Muestras	d_{\min} (μm)	d_{\max} (μm)	d_p (μm)
EtOH-W-1b	0,291	0,680	0,530
EtOH-2	0,461	0,799	0,632
EtOH-2b	0,420	0,782	0,619
EtOH-3	0,530	0,807	0,667
EtOH-3b	0,461	0,799	0,653
EtOH-4	0,386	0,638	0,550
EtOH-4b	0,373	0,644	0,557
Valor medio	0,417	0,736	0,601
Desv. estándar	0,077	0,078	0,055

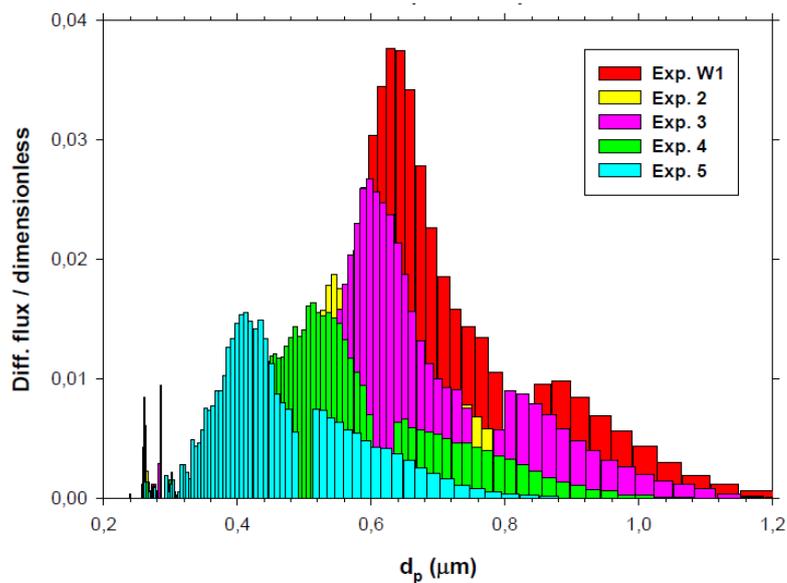


Figura 5.2 Distribución de tamaño de poro a lo largo de WET RUN y DRY RUN, para todas las muestras de la membrana PCL/IPA, mediante porometría de flujo capilar

Tabla 5.2 Valores de diámetro mínimo, máximo y medio (d_p) obtenido a para todas las muestras de PCL/IPA mediante porometría de flujo capilar

Muestras	d_{\min} (μm)	d_{\max} (μm)	d_p (μm)
IPA6-W-1	0,551	0,856	0,685
IPA6-W-1b	0,496	0,835	0,667
IPA6-2	0,441	0,720	0,605
IPA6-2b	0,414	0,706	0,605
IPA6-3	0,530	0,799	0,653
IPA6-3b	0,502	0,790	0,639
IPA6-4	0,414	0,650	0,550
IPA6-5	0,325	0,513	0,448
IPA6-5b	0,311	0,509	0,441
Valor medio	0,443	0,709	0,588
Desv. estándar	0,086	0,130	0,091

ANEXO IV. Experimentos de caracterización de flujo de agua

Tabla 5.3 Condiciones experimentales del experimento 1

Experimento	1
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

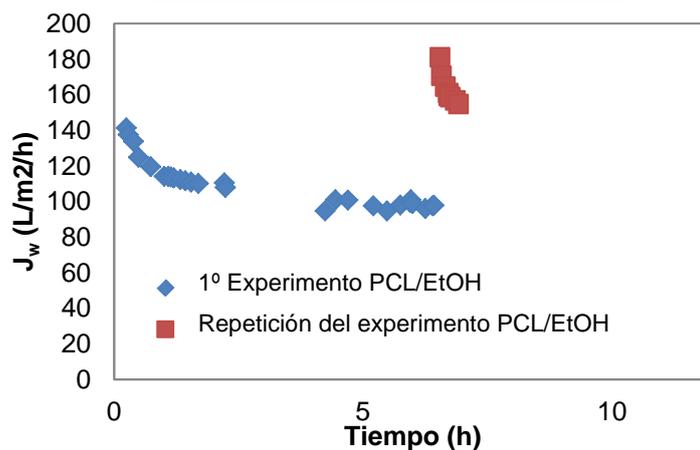


Figura 5.3 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.4 Condiciones experimentales del experimento 2

Experimento	2
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

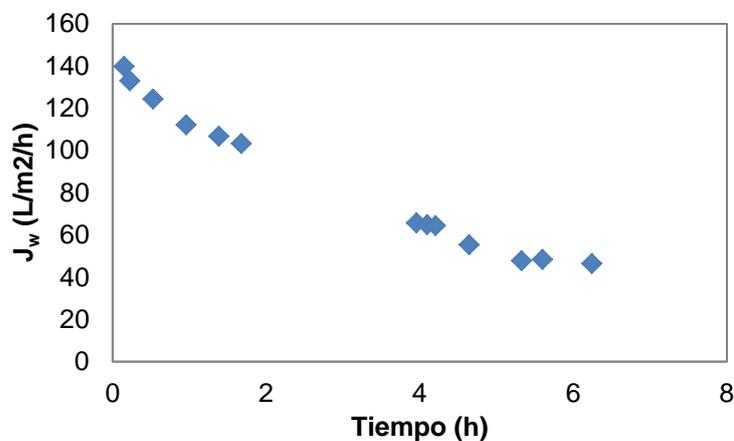


Figura 5.4 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.5 Condiciones experimentales del experimento 3

Experimento	3
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

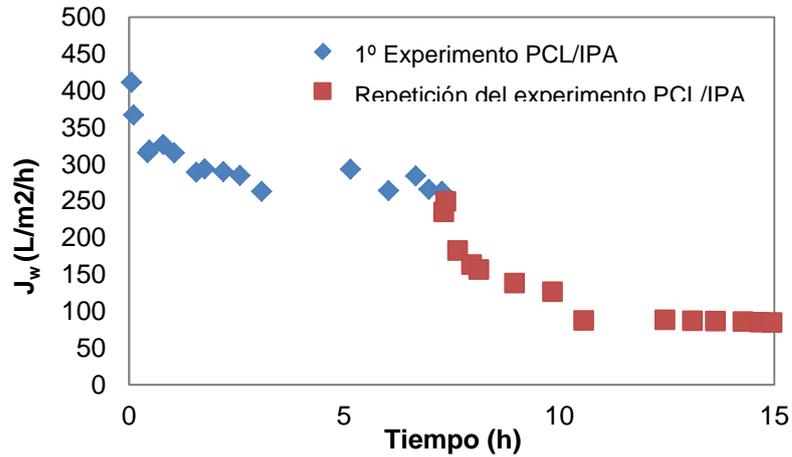


Figura 5.5 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.6 Condiciones experimentales del experimento 4

Experimento	4
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

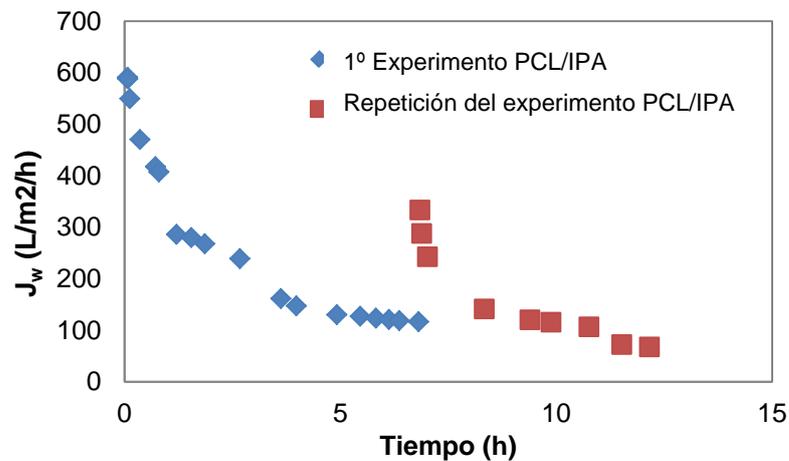


Figura 5.6 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.7 Condiciones experimentales del experimento 5

Experimento	5
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

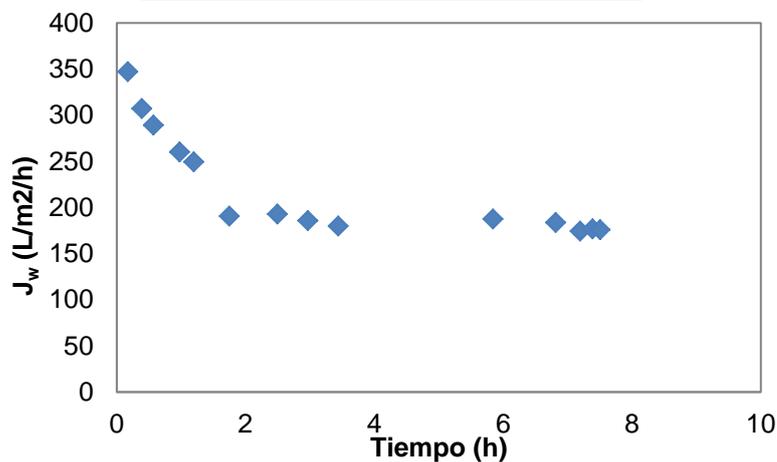


Figura 5.7 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.8 Condiciones experimentales del experimento 6

Experimento	6
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

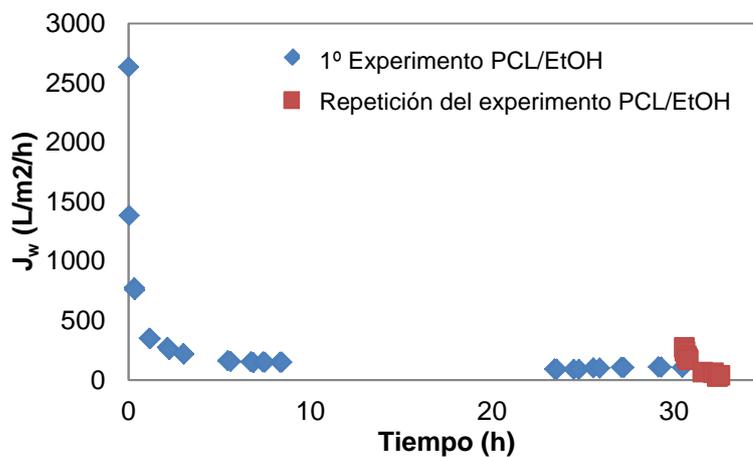


Figura 5.8 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.9 Condiciones experimentales del experimento 7

Experimento	7
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

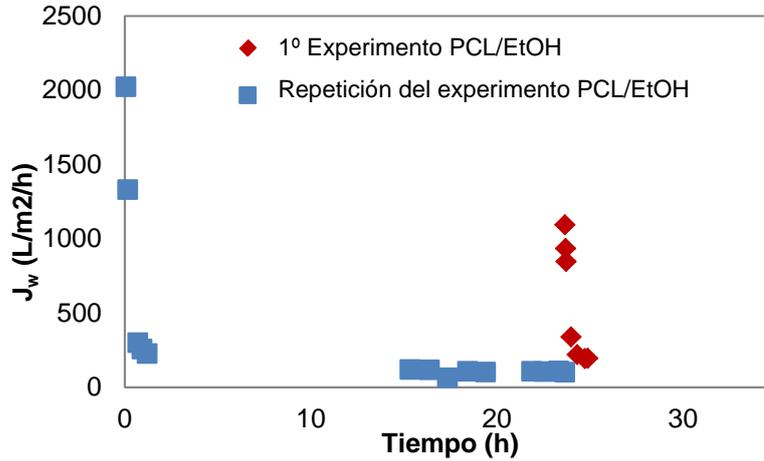


Figura 5.9 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.10 Condiciones experimentales del experimento 8

Experimento	8
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

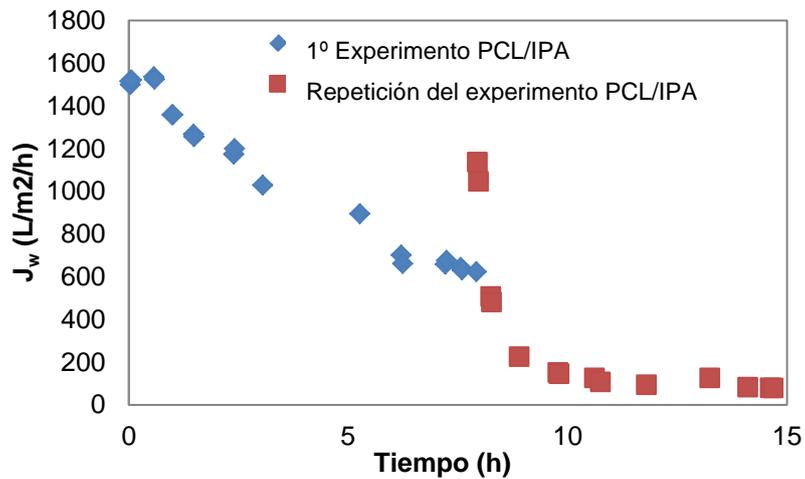


Figura 5.10 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.11 Condiciones experimentales del experimento 9

Experimento	9
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

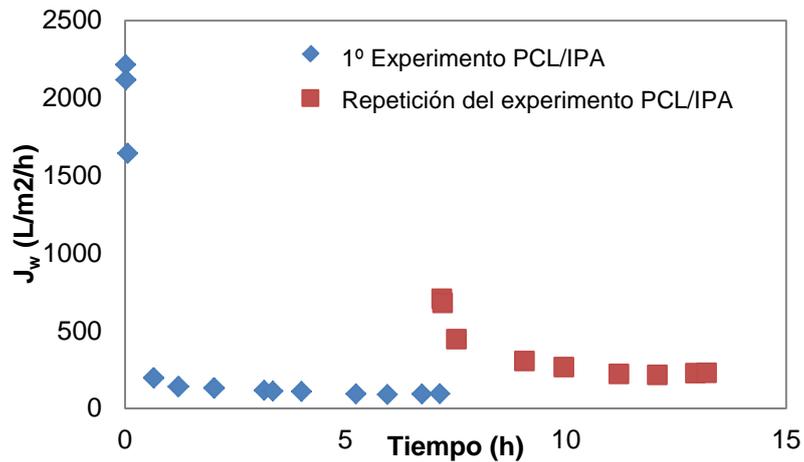


Figura 5.11 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento y su repetición, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.12 Condiciones experimentales del experimento 10

Experimento	10
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

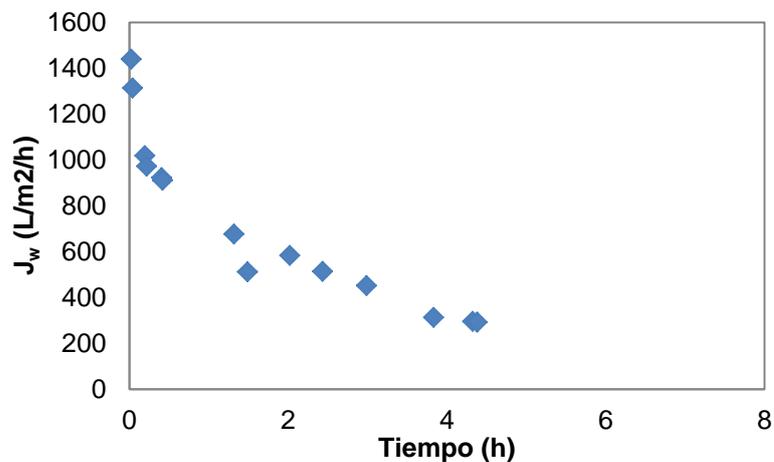


Figura 5.12 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.13 Condiciones experimentales del experimento 11

Experimento	11
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,4 bares
Fluido de filtración	Agua ultrapura

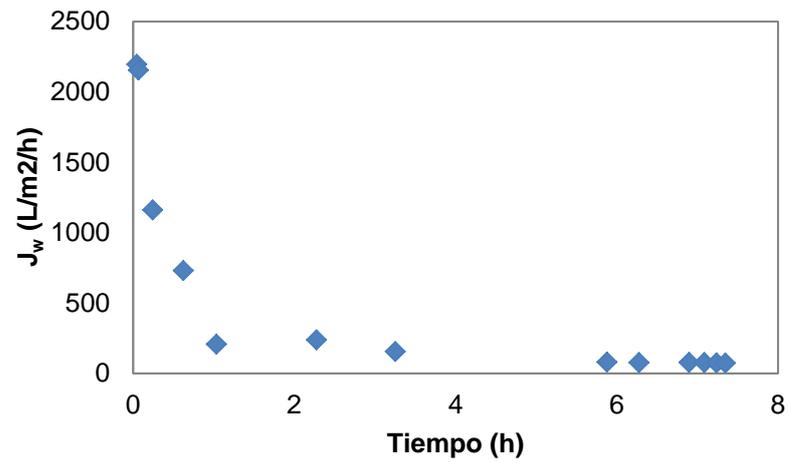


Figura 5.13 Flujo de agua ultrapura con el tiempo, durante del primer experimento, para la membrana PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial

ANEXO V. Experimentos de caracterización de flujo de BSA

Tabla 5.14 Condiciones experimentales del experimento 1

Experimento	1
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,3 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

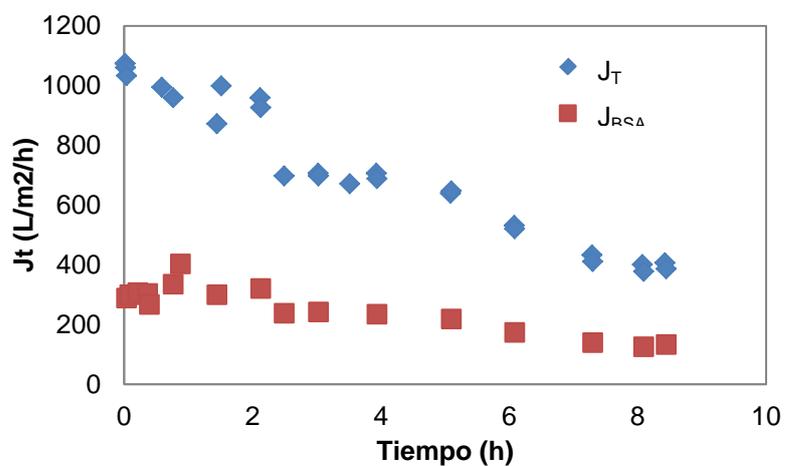


Figura 5.14 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal

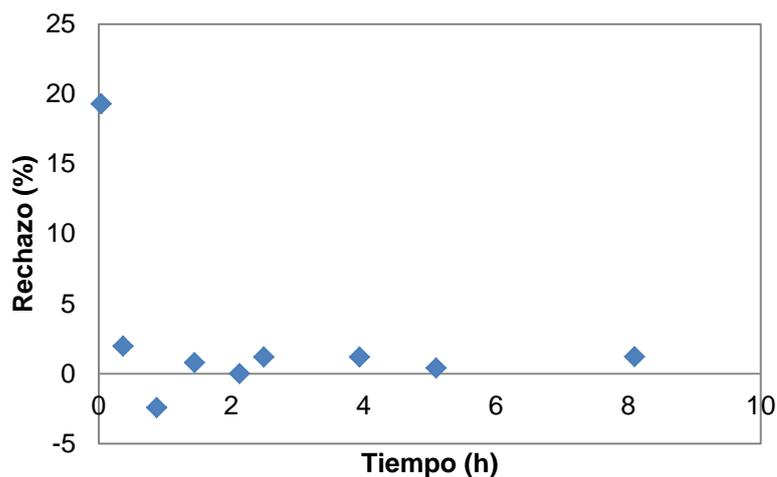


Figura 5.15 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.15 Condiciones experimentales del experimento 2

Experimento	2
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,3 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

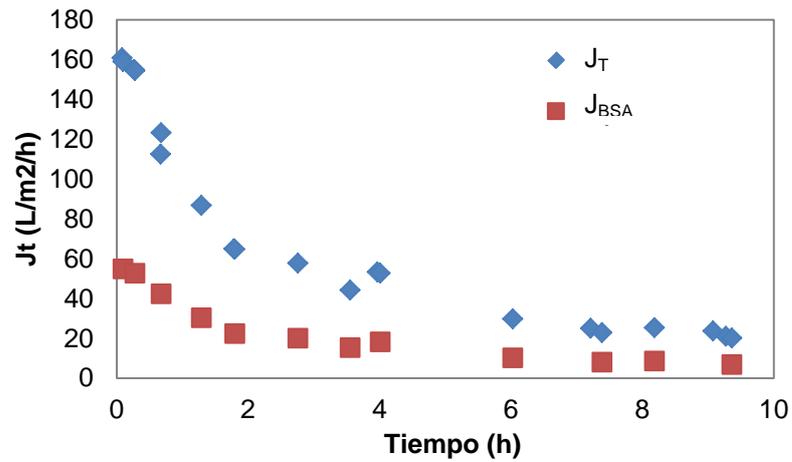


Figura 5.16 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal

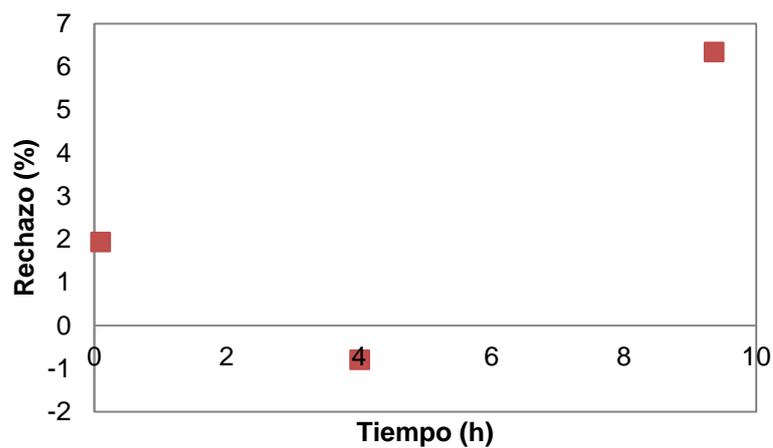


Figura 5.17 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.16 Condiciones experimentales del experimento 3

Experimento	3
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,3 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

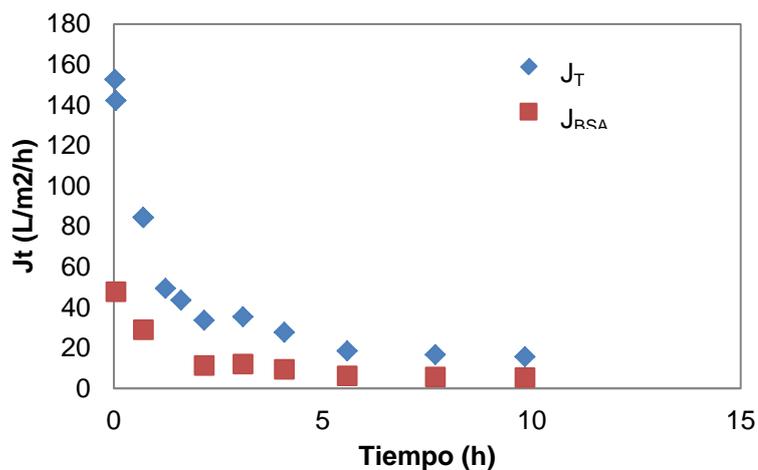


Figura 5.18 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

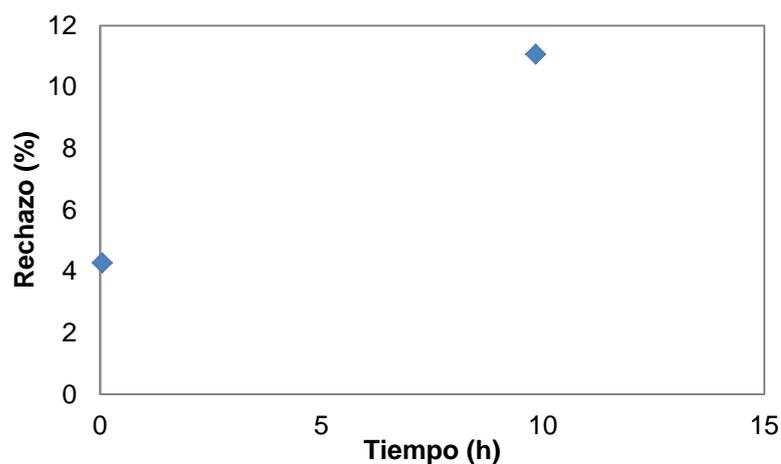


Figura 5.19 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.17 Condiciones experimentales del experimento 4

Experimento	4
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo lineal
Presión transmembranal	0,3 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

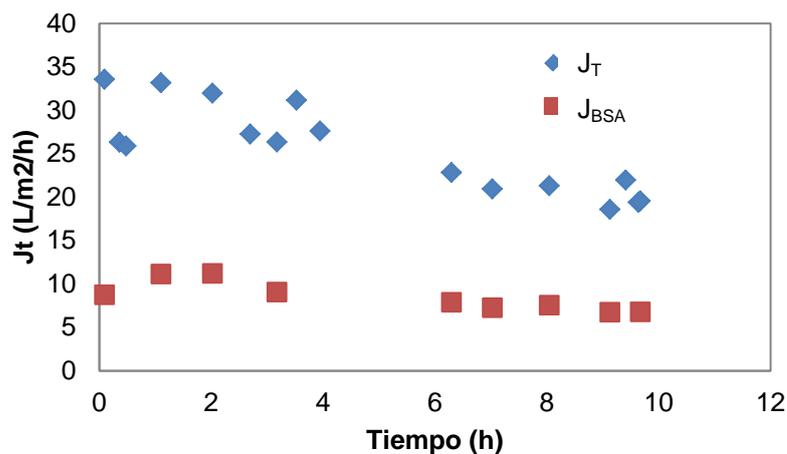


Figura 5.20 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

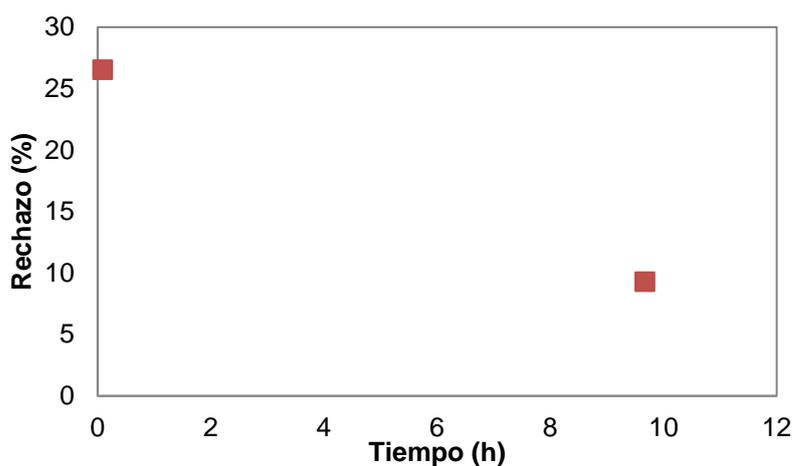


Figura 5.21 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo lineal

Tabla 5.18 Condiciones experimentales del experimento 5

Experimento	5
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,2 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

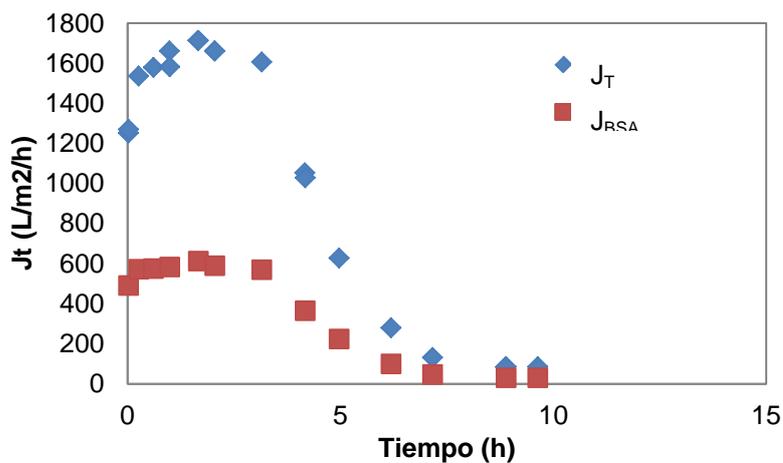


Figura 5.22 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial

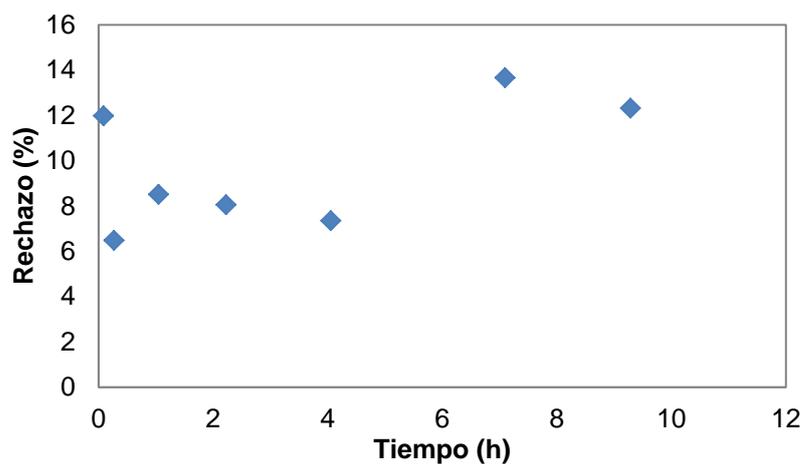


Figura 5.23 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.19 Condiciones experimentales del experimento 6

Experimento	6
Membrana	PCL/EtOH
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,2 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

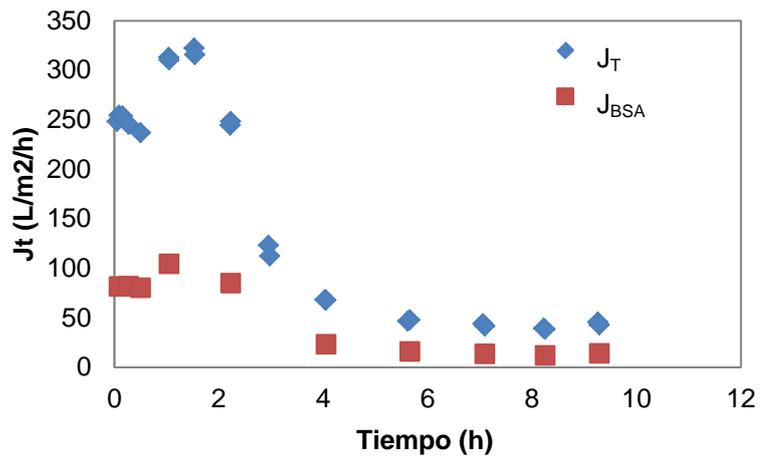


Figura 5.24 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial

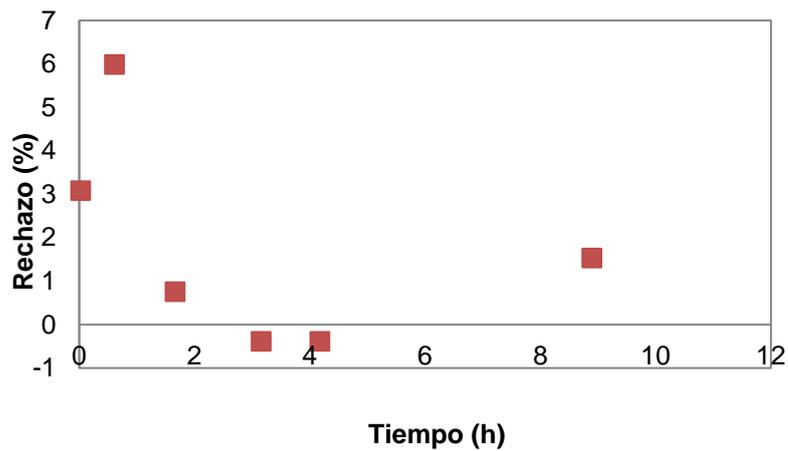


Figura 5.25 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/EtOH, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.20 Condiciones experimentales del experimento 7

Experimento	7
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,2 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

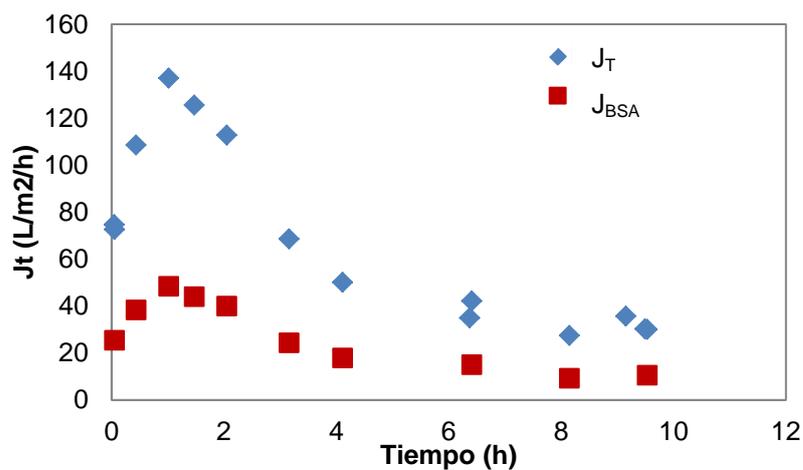


Figura 5.26 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial

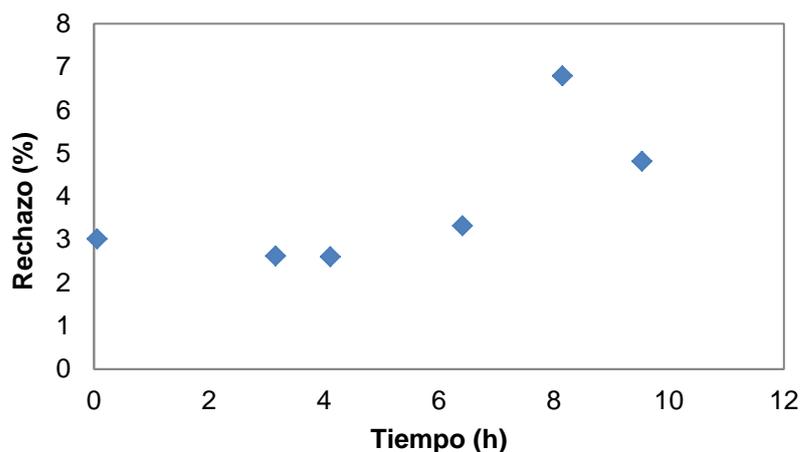


Figura 5.27 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial

Tabla 5.21 Condiciones experimentales del experimento 8

Experimento	8
Membrana	PCL/IPA
Sistema Experimental	Flujo tangencial
Presión transmembranal	0,2 bares
Fluido de filtración	Disolución BSA (0,4 g/L)

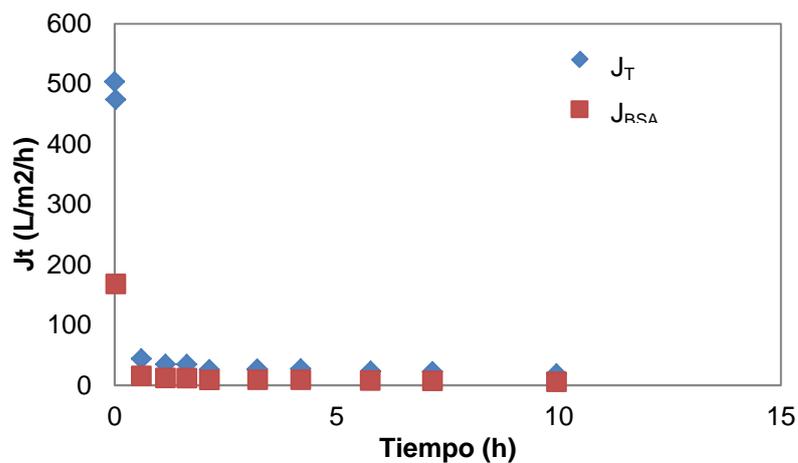


Figura 5.28 Flujo total y flujo de BSA con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial

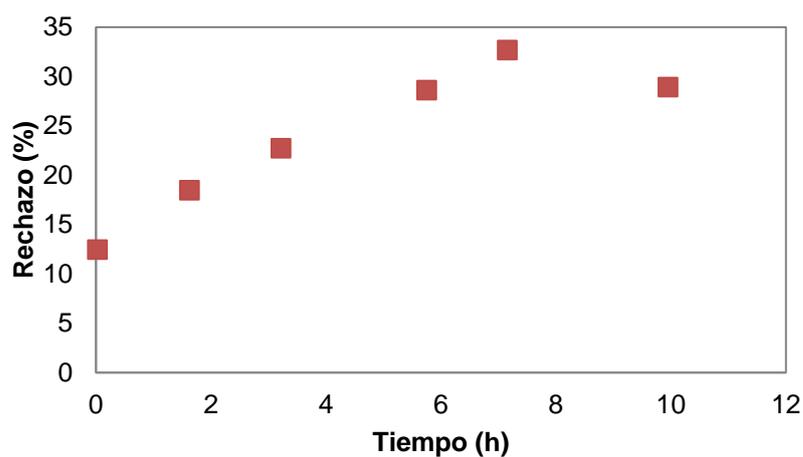


Figura 5.29 Rechazo con el tiempo, para la membrana de PCL/IPA, en el sistema de Flujo tangencial