

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Grado

**ESTUDIO DE LA UTILIZACIÓN DE AGENTES
PRESERVANTES DURANTE LA FABRICACIÓN DE
MEMBRANAS DE POLI (ϵ -CAPROLACTONA) EN SUS
PROPIEDADES DE TRANSPORTE DE NUTRIENTES EN
BIORREACTORES PARA INGENIERÍA TISULAR**

(Influence of the use of preservative solutions during the fabrication of poly (ϵ -caprolactone) membranes on the nutrients transport properties in biorreactors for tissue engineering)

Para acceder al Título de

Graduada en Ingeniería Química

Autor: Lucía del Barrio Argüello

Marzo-2016

ÍNDICE.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Ingeniería de tejidos.....	11
Características de soportes, scaffolds. Membranas poliméricas.....	13
1.2 Diseño de un biorreactor. Aspecto crítico en IT.....	19
1.3 Objetivo.....	22
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	23
2.1 Preparación de membranas poliméricas.....	24
2.2 Caracterización de las propiedades de transporte de nutrientes a través de las membranas.....	26
2.2.1 Caracterización de flujo de agua ultrapura (UP).....	28
2.2.2 Caracterización de transporte de disolución modelo de BSA.....	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1 Caracterización de flujo de agua ultrapura (UP).....	35
3.2 Caracterización de transporte de disolución modelo de BSA.....	36
4. CONCLUSIONES.....	48
5. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Nutrientes existentes en un medio de cultivo

Tabla 1.2 Tipos de materiales para aplicaciones *suaves* en IT

Tabla 1.3. Tipos de materiales para aplicaciones *duras* en IT

Tabla 1.4. Tipos de biorreactores en IT

Tabla 3.1. Espesores para cada tipo de membrana

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación gráfica de la ingeniería de tejidos [1]

Figura 2.1. Disolución de la PCL en el disolvente con ayuda de un agitador de rodillos

Figura 2.2. Cuchillo, casting knife.

Figura 2.3. Equipo de caracterización de permeabilidad de nutrientes de las membranas en configuración de flujo tangencial.

Figura 2.4. Detalle de la celda de la membrana del equipo de flujo tangencial. “A” indica la circulación de la fase Alimentación. “P” indica la salida del permeado y “R” el retorno de la fase Rechazo al tanque de alimentación.

Figura 2.5. Recogida de datos automatizada a partir de los que determinar el flujo de permeado

Figura 2.6. Ejemplo recta de calibrado a partir de los valores de absorbancia de las diferentes concentraciones BSA.

Figura 3.1. Evolución característica del flujo adimensional de agua UP para membranas PCL/UP para cada intervalo de presión (0.04-0.16 bar)

Figura 3.2. Evolución característica del flujo adimensional de agua UP para membranas PCL/Gly para cada intervalo de presión (0.04-0.16 bar)

Figura 3.3. Evolución característica del flujo adimensional de agua UP para membranas PCL/UEtG para cada intervalo de presión (0.04-0.16 bar)

Figura 3.4. Flujo inicial para cada tipo de PCL

Figura 3.5. Caída de flujo promedio (FC) sufrida por las membranas según el uso del tipo de preservante.

Figura 3.6. Representación de la relación de las presiones transmembranales de membranas representativas de PCL/UP, PCL/Gly y PCL/EtG. Flujo de agua UP para cada valor de presión (subida y bajada)

Figura 3.7. Permeancia promedio o en estado estacionario para cada tipo preservante en las membranas de PCL

Figura 3.8. Caída de flujo PCL/Gly en el ensayo de etanol

Figura 3.9. Caída de flujo PCL/EtG en el ensayo de etanol

Figura 3.10. Comparativa de permeancias en agua UP para membranas PCL/Gly en función de su protocolo de lavado.

Figura 3.11. Comparativa de permeancias en agua UP para membranas PCL/EtG en función de su protocolo de lavado.

Figura 3.12. Evolución con el tiempo de la membrana PCL/UP para los ensayos de filtración de agua UP y disolución de BSA

Figura 3.13. Evolución con el tiempo de la membrana PCL/Gly para los ensayos de filtración de agua UP y disolución de BSA

Figura 3.14. Evolución con el tiempo de la membrana PCL/EtG para los ensayos de filtración de agua UP y disolución de BSA

Figura 3.15. Permeancias (L/m^2hbar) promedio de agua UP para cada tipo de membrana

Figura 3.16. Permeancias (L/m^2hbar) promedio de disolución de BSA para cada tipo de membrana

Figura 3.17. Porcentaje de rechazo de BSA a lo largo del tiempo para cada tipo de membrana

Nomenclatura

IT	Ingeniería de tejidos
ECM	Matriz extra celular
FDA	<i>"Food and Drug Administration"</i>
PCL	Policaprolactona
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poliláctico-co-glicólico
HF	<i>"Hollow fiber"</i>
UP	Ultrapura
BSA	Bovine Serum Albumin
PES	Polietersulfona
PEEK-WC	Polieteretercetona
PS	Polisulfona
PAN	Poliacrilonitrilo
TME	Transferencia de masa externa,
TMI	Transferencia de masa interna
PCL/UP	Membranas de poli (ϵ -caprolactona) conservada en agua ultrapura
PCL/Gly	Membranas de poli (ϵ -caprolactona) conservada en glicerol
PCL/EtG	Membranas de poli (ϵ -caprolactona) conservada en etilenglicol
K_w	Permeancia del agua de la membrana ($L/m^2 h bar$)
J_w	Flujo de agua UP en el permeado ($L/m^2 h$)
ΔP	Presión transmembranal (bar)
$J_{w,dim}$	Flujo de agua adimensional ($\bar{}$)
$J_{w,t}$	Flujo de agua UP en el permeado a cada valor de tiempo (L/m^2h)

J_{w0}	Flujo de agua UP en el permeado al inicio del ensayo (L/m ² h)
FC	Caída de flujo
J_{WSS}	Flujo de agua en estado estacionario (L/m ² h)
J_{TBSA}	Flujo total de disolución de BSA en el permeado (L/m ² h)
K_{TBSA}	Permeancia total de disolución de BSA (L/m ² h bar)
C_P	Concentración de BSA en el permeado (g/L)
C_T	Concentración de BSA en la alimentación (g/L)
C_R	Concentración de BSA en el retenido (g/L)
J_{BSA}	Flujo de BSA en el permeado (g/m ² h)
K_{BSA}	Permeancia de BSA (L/m ² hbar)
R	Rechazo de BSA (%)

Palabras clave

Ingeniería de tejidos, membranas poliméricas, poli (ϵ -caprolactona), preservante.

RESUMEN

Desde los años 30 la ingeniería de tejidos (IT) trata de proporcionar alternativas a los tratamientos convencionales de trasplante de órganos que han perdido su funcionalidad. Se estudia la regeneración de tejidos mediante la elaboración de estructuras biocompatibles y biodegradables cuya morfología sea acorde con la zona en la que vaya a ser insertado y que aporten a las células el ambiente adecuado para su adherencia, proliferación y aporte de nutrientes [1,2].

En este trabajo se plantea la utilización de membranas poliméricas que actúen como soportes o scaffolds en la IT, lo cual garantiza por un lado la una alta permeancia de nutrientes y por otro la eliminación de desechos para la proliferación y diferenciación celular. El polímero elegido es debido a los resultados presentados en trabajos anteriores del grupo de investigación de Tecnologías Ambientales y Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Química y Biomolecular de la Universidad de Cantabria [21].

El polímero elegido es la poli (ϵ -caprolactona) (PLC). Así mismo, de estos trabajos se define que el tipo de membrana con mejores propiedades para la adherencia y proliferación celular, así como de transporte de nutrientes son aquellas fabricadas mediante la técnica de inversión de fases usando isopropanol (IPA) como baño coagulante. La disolución polimérica empleada ha sido también la misma (15 % v/v PCL/N-metil-2-pirrolidona) [24]

En este trabajo se analiza la influencia del uso de preservantes de glicerina (Gly) y etilenglicol (EtG) sobre el efecto de las propiedades de transporte de nutrientes de la membrana. Para ello se evalúa el comportamiento del transporte de nutrientes en un sistema de filtración tangencial, tanto mediante la caracterización de flujo de agua ultrapura UP como el flujo de transporte de nutriente de una disolución modelo de proteína Bovine Serum Albumin (BSA). El protocolo de limpieza también será evaluado.

RESULTADOS

Se lleva a cabo la comparativa de las membranas secadas después de haber sido sumergidas en una disolución de preservante (Gly ó EtG) respecto de las membranas recién fabricadas que han sido mantenidas húmedas hasta su caracterización de propiedades de transporte.

Tanto para la caracterización de flujo de agua ultrapura como de disolución modelo de BSA se detallarán datos de permeancia y caídas de flujo con el tiempo y para la disolución de BSA además se analizará el rechazo de la proteína.

Se realizará una comparación cuantitativa y cualitativa de dichos parámetros y se concluirá la viabilidad o no del uso de agentes preservantes.

CONCLUSIONES

Como conclusión se puede confirmar el efecto negativo de los preservantes en las membranas de PCL. Las caracterizaciones de flujo de agua aportan datos de permeancias de las PCL/Gly (1061 ± 475 L/m²hbar) y PCL/EtG (637 ± 146 L/m²hbar) de uno o dos órdenes de magnitud inferiores respecto a las PCL/UP (16400 ± 3540 L/m²hbar).

El protocolo de limpieza ha sido evaluado sin que se hayan observado mejoras en el comportamiento de las membranas. Dichos resultados se han obtenido utilizando dos métodos de limpieza de la membrana, diferentes. Por un lado agua ultrapura y por otro un baño de etanol. Resultaron valores de flujo y permeancia insuficientes para que las membranas con preservante sean viables en aplicaciones de la ingeniería tisular.

Por otro lado la caracterización de flujo de disolución de BSA ha proporcionado información acerca del rechazo que provoca cada tipo de membrana PCL. Se confirma que el uso de preservantes en las membranas provoca elevados porcentajes de rechazo frente a las membranas sin baño de preservación. Dichos valores se traducen en membranas que no proporcionarían el transporte de nutrientes necesarios para la regeneración celular, lo cual provocaría la muerte celular.

REFERENCES

[1] Diban N. Stamatialis D. "Polymeric hollow fiber membranes for bioartificial organs and tissue engineering applications" 2014. Society of Chemical Industry. Wiley Online Library.

[2] "Scaffolds implants for the bone regeneration. Materials, techniques and modeling" (Consulta 18 Febrero 2016) http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol_29_1_10/ibi08110.htm

[21] Gómez Ruiz, B. 2014. Caracterización de las propiedades de transporte de membranas biodegradables de poli-ε-caprolactona en ingeniería tisular. DIBAN, N. (dir.). Proyecto Fin de Carrera, Universidad de Cantabria.

[24] N. Diban. Dimitrios Stamatialis. *Effect of Surface Morphology of Poly(ε-caprolactone) Scaffolds on Adipose Stem Cell Adhesion and Proliferation*. Macromol. Symp. 2013, 334, 126–132.

Keywords

Tissue engineering, Poly (ϵ -Caprolactone), polymeric membrane, preservatives.

SUMMARY

Since the Thirties, the tissue engineering tries to provide alternatives to the conventional organ transplants treatments that have lost their functionality. Tissue regeneration is studied through the development of biocompatible and biodegradable structures whose morphology is in line with the area where it will be inserted [1, 2].

The tissue engineering uses polymeric membranes which act as support or scaffolds, ensuring the high permeance of nutrients and the waste disposal for the proliferation and differentiation of cells. The chosen polymer in this work is poly (ϵ -caprolactone) (PCL). Different membranes will be prepared through phase inversion technique and these will be subjected to a tangential flow filtration system. Two methodologies will be carried out: a characterization of ultrapure water flow and also, the nutrient transport flow of a protein Bovine Serum Albumin (BSA) model solution [21, 24].

RESULTS

Three types of membranes will be evaluated, those made from the poly (ϵ -caprolactone) PCL and then, those which have been subjected to preservation, specifically using as preservatives glycerine and ethylene glycol, preservatives widely used in the conservation of polymeric membranes.

For both methodologies, permeance and flow drop o flow rate data will be detailed and for the second methodology, BSA concentrations will be known for the permeate flow, retentate and supply tank. A quantitative and qualitative comparison of these parameters will be made and to conclude, the viability or not of the use of preserving agents will be deduced.

CONCLUSIONS

In conclusion, with this final degree project, we can confirm the negative effect of the preservatives in the PCL membranes. The water flow characterizations provide data permeances of PCL / Gly and PCL / EtG one or two orders of magnitude lower compared to PCL / UP.

These results were obtained using two different methods for membrane cleaning. Firstly, the membranes were immersed in UP water 24 hours before analysing them. Due to the lack of prior information, we developed a new cleaning method to remove any possible traces of preservative in the membrane because this fact could be the reason why the permeances were so low after cleaning with UP water. Once again, after ethanol bath, the

flow and permeances data were insufficient in order to consider the membranes were viable in tissue engineering applications.

On the other hand, the characterization of BSA solution flow has provided information about the rejection that each type of PCL membrane causes. It is confirmed that using preservatives in the membranes causes a high rate of rejection compared to the membranes without preservation bath. These values mean that the membranes are not valid to provide the necessary transport of nutrients for cell regeneration, which would cause the dead cell.

REFERENCES

[1] Diban N. Stamatialis D. "Polymeric hollow fiber membranes for bioartificial organs and tissue engineering applications" 2014. Society of Chemical Industry. Wiley Online Library.

[2] "Scaffolds implants for the bone regeneration. Materials, techniques and modeling" (Consulta 18 Febrero 2016) http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol_29_1_10/ibi08110.htm

[21] Gómez Ruiz, B. 2014. Caracterización de las propiedades de transporte de membranas biodegradables de poli-ε-caprolactona en ingeniería tisular. DIBAN, N. (dir.). Proyecto Fin de Carrera, Universidad de Cantabria.

[24] N. Diban. Dimitrios Stamatialis. *Effect of Surface Morphology of Poly(ε-caprolactone) Scaffolds on Adipose Stem Cell Adhesion and Proliferation*. Macromol. Symp. 2013, 334, 126–132.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

Los tejidos dañados total o parcialmente y la pérdida funcional de los órganos suponen uno de los problemas más costosos y graves de la medicina actual. Tradicionalmente dichos problemas se han paliado mediante el trasplante de órganos y tejidos. Se trata de una opción eficiente pero a la vez limitada por la baja disponibilidad de donantes y el alto riesgo de incompatibilidad.

Es debido a esta creciente necesidad por lo que se está estudiando la utilización de células y biomateriales para la reconstrucción de tejidos y órganos. Estas investigaciones han dado nombre a lo que hoy se conoce como Ingeniería de Tejidos (IT) [1, 7].

La IT es un amplio campo que involucra tanto ciencias materiales como principios biológicos e ingenieriles. El principal objetivo es la regeneración de tejidos dañados u órganos cuya función estructural difícilmente puede ser restaurada por los tratamientos convencionales y requiere sustitución o trasplante. Se requiere el desarrollo de estructuras biocompatibles y biodegradables con morfología apropiada para la interacción con el tejido.

Los tejidos de ingeniería por lo general se construyen utilizando estructuras de soporte, scaffolds, favoreciendo así la unión, proliferación y diferenciación celular. La aplicación de las estructuras en la IT se ilustra en la figura 1.1 [1].

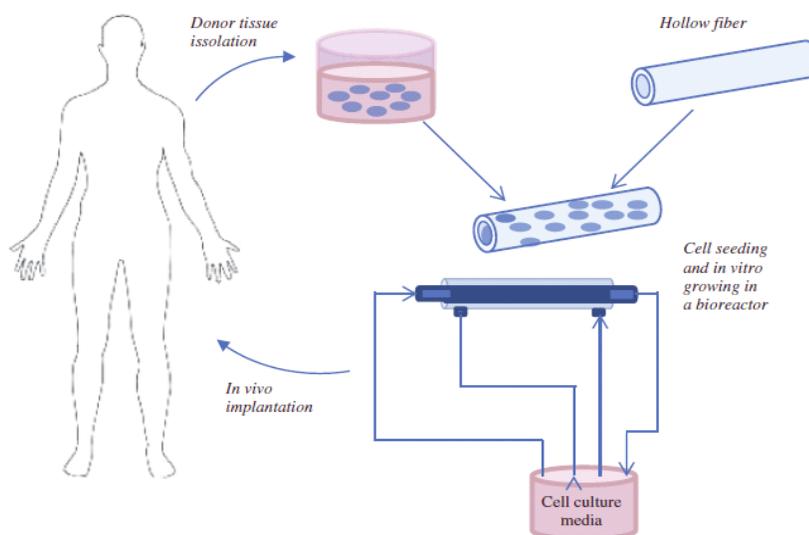


Figura 1.1. Representación gráfica de la ingeniería de tejidos [1]

La IT se fundamenta en la extracción, aislamiento y expansión de las células autógenas del paciente y en el cultivo de las mismas dentro de un biorreactor sobre una estructura soporte que permita una adherencia y proliferación adecuadas y se favorezcan las condiciones para la diferenciación de estas células en el tejido objetivo. Cuando la funcionalidad y tamaño del tejido sean suficientes se implantaría en el paciente reemplazando o complementando las funciones del tejido u órgano dañado.

Se persigue la elaboración de tejidos lo más similar funcionalmente al tejido natural. Por ello es condición necesaria conocer dichas condiciones naturales, destacando la matriz extracelular (ECM). Se trata de una matriz soporte esencial para mantener a las células unidas, ya que permite la adhesión de las células para formar tejidos. La ECM se compone de proteínas estructurales (colágeno, elastina), glúcidos, glucoproteínas y factores de crecimiento.

La ECM es una estructura donde se asientan los tejidos, por lo que deben permitir la interacción con el cultivo, favorecer la adhesión celular, el transporte de nutrientes y no generar productos de degradación tóxicos, lo que provocaría una respuesta inflamatoria *in vivo*. La interacción entre la ECM y las células favorece la migración, proliferación y diferenciación celular. Las estructuras o scaffolds se fabrican buscando la similitud con la ECM.

La IT se sustenta sobre tres pilares básicos:

- Prevenir una respuesta inmunológica.
- Creación de un sustrato para el desarrollo y diferenciación celular que imite a la ECM.
- Favorecer un medio adecuado para el desarrollo celular.

La primera aplicación de las membranas en la medicina fue en equipos de purificación de sangre, en 1970, se propusieron como catéteres para la administración local de medicamentos y hoy en día son una pieza clave en prácticas médicas diarias [1, 21].

La regeneración de tejido mediante IT involucra en la mayoría de los casos una etapa *in vitro* en cultivos en estático. Sin embargo este método presenta una gran desventaja, la ausencia de un ambiente mecánico que someta el tejido a cargas, debido a que las fuerzas mecánicas son reguladoras de la función celular e influyen en la estructura del tejido que se está formando, y sobre todo limitaciones de tipo difusivo de los nutrientes.

Es por ello por lo que se utilizan biorreactores, los cuales aumentan la transferencia de nutrientes influyendo en la estructura del tejido y aplican estímulos mecánicos..

Actualmente existen tres estrategias terapéuticas en IT para el tratamiento de tejidos dañados o enfermedades en pacientes [6]:

- Regeneración con células madre: 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.

- Regeneración *in vitro*: implantación de tejido procedente de células y soporte o scaffold, cuando ha crecido y desarrollado por completo.

- Regeneración *in vivo*: un scaffold se implanta en la zona del tejido dañado, para promover el crecimiento celular en esa zona.

CARACTERÍSTICAS DE LOS SOPORTES Ó SCAFFOLDS. MEMBRANAS POLIMÉRICAS [2]

A la vista de las características necesarias indicadas anteriormente, las membranas poliméricas tienen un elevado potencial para ser usados como scaffolds en IT. Los métodos de fabricación de las membranas buscan controlar la estructura de éstas, tanto a nivel externo como interno, ya que son parámetros de diseño de ingeniería necesarios para lograr la regeneración de tejidos.

El objetivo principal es lograr la reconstrucción de tejidos y para ello es imprescindible cumplir ciertos requisitos básicos. Es crucial una alta porosidad y un tamaño de poro adecuado que facilite la difusión y siembra de células a lo largo de toda la estructura.

Para describir las propiedades y características de su arquitectura, se consideran tres escalas:

-*Macro-escala*: se controla su geometría, forma externa, propiedades mecánicas, densidad y porosidad. Cuanto mayor sea ésta última habrá un mayor transporte de nutrientes y facilidad de proliferación y migración celular.

-*Micro-escala*: la componen características como tamaño de poro y degradabilidad.

-*Nano-escala*: se estudian factores como topología de la superficie de los poros y la fisicoquímica superficial.

A partir de sus características y propiedades, los scaffolds deben cumplir las siguientes funciones:

-Permitir la migración y unión celular.

-Favorecer la difusión de nutrientes vitales para la célula.

-Modificar el comportamiento de fase celular ejerciendo influencias mecánicas y biológicas.

Las recientes investigaciones se basan en el desarrollo de scaffolds elaborados a partir de biomateriales que cumplan requisitos específicos:

-*Biocompatibilidad*: integrarse al organismo hospedero sin que haya efectos citotóxicos o respuesta inmune.

-Resistencia y compatibilidad mecánica: resistir cargas mecánicas según sea el lugar en el que se implanta. Entre las propiedades mecánicas se encuentra el módulo de elasticidad, resistencia a tracción, a fractura y fatiga.

-Biodegradabilidad: es un factor esencial, ya que dichos scaffolds deben ser absorbidos preferentemente por los tejidos circundantes y no por eliminación quirúrgica. La velocidad de degradación debe ser lo más parecida a la tasa de formación de tejido.

Las membranas utilizadas en IT deben favorecer el aporte de nutrientes a la célula. Por ello es necesario proporcionar una distribución uniforme de nutrientes al sistema de cultivo y así obtener un crecimiento homogéneo de células, y en definitiva, del tejido. El suministro de nutrientes puede realizarse por difusión pasiva o de forma activa mediante perfusión directa, aunque esta forma presenta cierta complejidad respecto al diseño del sistema.

En función de los requerimientos del tejido que se desea desarrollar, existen medios de cultivo diferentes. En la tabla 1.1 se recogen los nutrientes que deben existir en cualquier medio de cultivo [4, 21]:

NUTRIENTES EN UN MEDIO DE CULTIVO	
Aminoácidos	El suplemento más común es glutamina, en otras ocasiones, glutamato.
Vitaminas	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.
Glucosa	Es la fuente de energía principal en muchos medios. Forma parte de la mayoría de los ciclos metabólicos, generando en ocasiones CO ₂ .
Hormonas	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

Tabla 1.1. Nutrientes existentes en un medio de cultivo

Ya que las membranas poliméricas cumplen las características acordes a los scaffolds descritos, la IT utiliza éstas para que actúen como soportes, ya que permiten una alta permeancia de nutrientes y la eliminación de desechos para la proliferación y diferenciación celular. La versatilidad en la procesabilidad de las membranas poliméricas permite adaptar la morfología de la membrana para asemejarse a la ECM natural del tejido natural. Además existe un amplio rango de materiales poliméricos con propiedades biocompatibles que han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), tales como policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA) y poliláctico-co-glicólico (PLGA) [3]. La técnica de fabricación más relevante y fácil de producir las membranas poliméricas es la inversión de fases.

Dicha técnica es un proceso controlado en el que se produce la precipitación o coagulación del polímero presente en la disolución polimérica previamente preparada. En el proceso de inversión de fases están involucradas 3 fases: un polímero, un disolvente (del polímero) y un coagulante (disolvente que no solubilice el polímero). La disolución polimérica compuesta por el disolvente y el polímero al sumergirse en el coagulante comienza a precipitar la fase polimérica al producirse el intercambio entre las fases disolvente y coagulante.

La versatilidad de este método proporciona a las membranas una amplia gama de características morfológicas, mecánicas y permeables por lo que se pueden adaptar a los requisitos de la regeneración de tejidos y una morfología de la superficie que promueve la unión y la proliferación celular. Un importante reto de futuro es el desarrollo de nuevas membranas degradables y reabsorbibles, con tamaño de poro óptimo, características óptimas de morfología y biocompatibilidad adaptado a aplicaciones específicas.

Los materiales poliméricos para la fabricación de estas membranas se pueden clasificar en función de las propiedades mecánicas requeridas en las distintas aplicaciones de la IT. Existen por lo tanto dos grupos diferenciados, aplicaciones “blandas o suaves”, como músculo esquelético, y aplicaciones “duras”, como el tejido óseo. Ambos casos están recogidos en las tablas 1.2 y 1.3:

APLICACIONES SUAVES	
ORIGEN NATURAL	Colágeno: Componente matriz extracelular ECM
	Fibrina
	Poli (hidroxibutirato)
	Gelatina
	Polisacáridos
	Más comunes: ácido hialurónico, almidón
ORIGEN SINTÉTICO	Poliésteres
	Poli(ϵ -caprolactonas)
	Poli(anhídridos)
	Poli(ortoésteres)
	Poli(fumaratos de propileno)
	Más comunes: ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA)

Tabla 1.2. Tipos de materiales para aplicaciones *suaves* en IT [2]

APLICACIONES DURAS		
ORIGEN SINTÉTICO	CERÁMICAS	Hidroxiapatita
		Metafosfato de calcio
		Fosfato tricácico
	VIDRIOS	Sílice
		Bioglass
	COMPUESTOS	Ácido propiláctico / Fosfato tricácico / Sílice y/o cerámica
		Fosfato de calcio / titanio y/o boro
		Hidroxiapatit / Poli(ϵ -caprolactona) / quitosano y/o colágeno
	METALES	Titanio
		Aluminio
		Acero inoxidable

Tabla 1.3. Tipos de materiales para aplicaciones *duras* en IT [2]

Los materiales naturales, tales como el colágeno o la elastina presentan una matriz extracelular (ECM), fuente del tejido animal o vegetal. Estos ejemplos han sido empleados para la construcción de soportes artificiales ya que promueven el crecimiento y la diferenciación celular.

La mayoría de los polímeros naturales son enzimáticamente degradables. La principal limitación de los materiales cuyo origen es una proteína animal, es su alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y respuesta inmune. Además, otro motivo de preocupación es el alto coste de todos estos materiales naturales, y sus dificultades de procesabilidad. Es por eso por lo que se ha observado y los polímeros sintéticos presentan ventajas frente a los naturales.

Haciendo referencia a la biodegradabilidad [3] de los polímeros sintéticos, los podemos diferenciar en polímeros degradables y no degradables. Así y todo, para obtener las condiciones óptimas del material a utilizar, en ocasiones se recurre al mezclado de dichos polímeros.

- *Polímeros sintéticos degradables*

Los polímeros sintéticos biodegradables han sido ampliamente utilizados como soporte en la IT, concretamente los poliésteres aprobados por la FDA "Food and Drug Administration", los citados PCL, PLGA, PLA. De estos tres poliésteres, PCL es el más económico y el que presenta mayor elasticidad; sin embargo tiene muy poca resistencia a la tracción. Por el contrario, PLA y PLGA tienen un módulo de elasticidad elevado, son más rígidas y tienen mayor resistencia a la tracción, que puede ser complementaria a las propiedades mecánicas de PCL.

- *Polímeros sintéticos no degradables*

En biorreactores de perfusión para la expansión celular, se utilizan polímeros sintéticos no degradables. Los más empleados son polietersulfona (PES), polietere tercetona (PEEK-WC) y polisulfona (PS), y ocasionalmente poliacrilonitrilo (PAN). Concretamente PES y PS, han sido tradicionalmente empleados y están comercialmente disponibles.

- *Mezclado de polímeros*

Todos estos materiales pueden ser procesados solos o en forma de mezcla siempre y cuando sean miscibles. La mezcla de polímeros es una técnica que permite superar ciertas limitaciones que presentan de forma unitaria estos materiales, como pueden ser sus pobres propiedades mecánicas o su inadecuada velocidad de degradación.

Poli (ε-caprolactona) (PCL) fue el material seleccionado en el presente trabajo debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad a largo plazo. La PCL es un polímero con la particularidad de su baja velocidad de degradación, entre 1 y 2 años. Por una parte, esto favorece la estabilidad mecánica de la estructura hasta la completa regeneración de tejido y, por otro lado, la baja concentración de productos de degradación reduce la posibilidad de respuesta inmune de las células.

Entre las diferentes aplicaciones de las membranas PCL está su uso en biorreactores, que promueven el crecimiento de células neuronales, para después ser usados como modelos de tejidos *in vitro* y poder estudiar la terapéutica del cerebro [5].

La IT estudia las condiciones de trabajo óptimas que garanticen el crecimiento celular. Un método para lograr la preservación de las membranas poliméricas es la utilización de agentes conservantes. Los agentes preservantes también conocidos como conservantes son sustancias usadas para proteger preparaciones, por lo general, líquidas y semisólidas. Pueden interferir en el crecimiento, reproducción y/o metabolismo microbiano, y frecuentemente alteran la permeabilidad de la membrana celular. Cuanto más intensos son los tratamientos conservantes, menor es el número de microorganismos que permanecen viables, pero más variable es su número.

Las soluciones para la conservación de las membranas deben proporcionar el mantenimiento intacto de la estructura y reducir los riesgos de desarrollo microbiano durante largo tiempo y su comercialización. En trabajos anteriores se observaron cambios en el comportamiento de permeabilidad de las membranas cuando se usaron preservantes frente a los casos en que no se habían usado [3,21]. Los preservantes mantienen la estructura de morfología membrana desde su fabricación hasta su uso.

La glicerina es un tipo de alcohol también llamado glicerol. Se trata de un líquido que tiene la capacidad de atraer el agua que lo rodea, es decir, tiene capacidades hidrofílicas. La glicerina es una sustancia presente en todas las grasas y todos los aceites dentro de los animales y vegetales, con la característica de que se combinan con los ácidos grasos como el ácido esteárico, por ejemplo.

Como componente celular, la glicerina se encuentra en la membrana celular de todas las células, tanto vegetales como animales, bajo la forma de fosfolípidos. Esto quiere decir que se forma una molécula que cuenta un lado hidrofílico (que atrae el agua) y otro hidrófobo (que rechaza el agua). Posee múltiples propiedades, entre las que se encuentran sus buenas capacidades disolventes, su consistencia viscosa y su alto punto de ebullición.

Por su parte el etilenglicol es una sustancia líquida incolora, sintética que absorbe agua., ligeramente espeso, a temperatura ambiente es poco volátil y forma parte del grupo de los glicoles.

1.2 DISEÑO DE BIORREACTOR. ASPECTO CRÍTICO EN IT

Los biorreactores son una parte inevitablemente importante en toda estrategia de ingeniería de tejidos (IT), ya que ayudan a la construcción de tejidos funcionales tridimensionales. El uso de biorreactores permite un control preciso y continuo de las condiciones de cultivo celular y permiten también introducir diferentes estímulos al cultivo de tejidos.

Puesto que el objetivo último de un biorreactor es crear un producto biológico, los parámetros de ingeniería, como por ejemplo, transferencia de masa interna y externa, velocidad del fluido, esfuerzo cortante, distribución de corriente eléctrica, etc., son dignos de ser investigados a fondo. Los efectos de tales parámetros se han abordado en sólo unos pocos estudios anteriores, por lo tanto conocer los parámetros óptimos de ingeniería es crucial no sólo para reducir el coste y el tiempo de experimentos, sino también para mejorar la eficacia y la funcionalidad de la construcción de tejido [7].

Los biorreactores ayudan en la producción de tejidos funcionales de la siguiente manera:

- Manteniendo una concentración de células uniforme durante la siembra de células.
- Controlando parámetros: temperatura, pH, presión, estrés de cizalla.
- Facilitando la transferencia de masa.

Generalmente, las principales responsabilidades de un biorreactor son proporcionar un medio biomecánico y bioquímico que controle la transferencia de nutrientes y oxígeno a las células y los productos metabólicos de las células. Por otro lado, se deben tener en cuenta los problemas de transferencia de masa como por ejemplo, de suministro y de eliminación de metabolitos tóxicos de oxígeno y de nutrientes [9, 10].

Las condiciones de operación para diversos biorreactores pueden ser muy diferentes. Por lo tanto, es imprescindible el uso de ecuaciones matemáticas y técnicas de modelización para simular las condiciones de funcionamiento óptimas con el fin de predecir los mejores resultados [11].

-Transferencia de masa través de biorreactores [12]:

El gran obstáculo que impide la aplicación práctica de los scaffolds es la transferencia de masa. Los nutrientes, oxígeno y moléculas reguladoras tienen que ser transferidos de manera eficiente del medio de cultivo a las superficies de los tejidos (es decir, de transferencia de masa externa, TME), así como a las células del interior de la construcción de tejido (transferencia de masa interna, TMI).

Mientras que las tasas de TME dependen principalmente de las condiciones

hidrodinámicas en el biorreactor, las TMI lo hacen fuertemente de la estructura y porosidad del soporte, el tamaño total de células y la tasa de difusión a través del biomaterial.

-Estimulación mecánica. [14]:

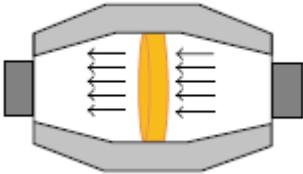
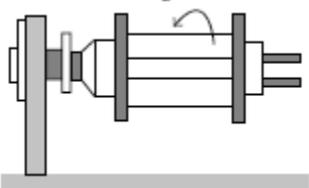
La determinación de cómo las fuerzas mecánicas pueden ser utilizadas es un desafío para el diseño de biorreactor. Las interacciones mecánicas durante el crecimiento de tejidos puede determinar si las células forman agregados celulares o se dispersan por todo el soporte. Las células en los agregados están expuestas a tensiones de cizallamiento más altas que las células individuales debido a su gran diámetro de partícula.

-Estimulación eléctrica [15]

Además de los estímulos mecánicos, comúnmente surge en el contexto de la IT, la estimulación eléctrica necesaria para obtener una funcionalidad adecuada de la ingeniería tisular. Los estímulos eléctricos son principalmente aplicados en el campo de la ingeniería de tejido cardíaco para regenerar la zona infartada tras una insuficiencia cardíaca.

Los biorreactores más utilizados en la IT son matraces estáticos y mixtos, de pared giratoria, y biorreactores de perfusión. Estos biorreactores ofrecen tres condiciones de flujo distintas, estática, turbulenta y laminar, y por lo tanto una velocidad diferente de suministro de nutrientes a la superficie del tejido [16].

La tabla 1.4 compara los parámetros de ingeniería de diferentes biorreactores [17]:

BIORREACTORES EN IT			
Tipo	Transferencia de masa	Tejido	Especificaciones
 <p>Perfusión</p>	<p>Difusión</p> <p>Esfuerzo cizalla: moderado</p>	<p>Intestinos</p> <p>Huesos</p> <p>Cartílago</p> <p>Arterias</p>	<p>Siembra y fijación de células humanas especialmente dentro scaffold.</p>
 <p>Rotación de pared</p>	<p>Alta convección</p> <p>Esfuerzo cizalla: bajo</p>	<p>Cartílago</p> <p>Huesos</p> <p>Piel</p>	<p>Condiciones de operación específicas.</p> <p>Suma importancia la velocidad de rotación.</p>

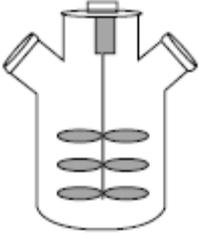
 <p>Matraz agitado</p>	<p>Alta convección</p> <p>Esfuerzo cizalla: alto</p>	<p>Cartílago</p>	<p>Creación de células altamente homogéneas.</p> <p>Difusión de nutrientes limitada.</p>
--	--	------------------	--

Tabla 1.4. Tipos de biorreactores en IT [17]

Entre los diferentes tipos de biorreactores, el biorreactor de perfusión es el más conveniente para cultivos de células animales en un soporte sólido poroso. Proporcionan las propiedades fisicoquímicas correctas y los estímulos del medio para las construcciones de ingeniería tisular. Por estas razones es el tipo de reactor elegido para el presente trabajo.

La supervivencia celular en muchas superficies de los tejidos de ingeniería se puede mejorar mediante cultivos en biorreactores de matraz agitado. Dentro de éstos, los soportes están unidos a agujas que cuelgan de la tapa del frasco para lograr una siembra dinámica [18]. El flujo convectivo permite la mezcla continua del medio que rodea la estructura. Este entorno mejora la difusión de nutrientes y promueve la proliferación celular a lo largo de la estructura en comparación a la condición estática. Sin embargo, las fuerzas de cizallamiento que actúan sobre las estructuras son heterogéneas, lo cual impide el desarrollo del tejido homogéneo. Con el fin de mejorar la TME en una condición de flujo laminar, las construcciones de tejido de ingeniería se pueden cultivar en biorreactores con rotación de pared.

El flujo laminar dinámico de biorreactores de rotación generalmente mejora las propiedades de la capa de tejido periférico. Además, en tales biorreactores, no se forma ninguna cápsula fibrosa, pero las limitaciones de la transferencia por difusión de oxígeno al interior se mantienen. En comparación con el flujo turbulento dentro de matraces agitados, el flujo laminar dinámico en biorreactores con rotación de pared contribuye a niveles reducidos de la tensión de cizallamiento experimentadas por las células. Entre otros, esto ayuda en la formación de tejidos cartilagosos [16,19].

1.3 ANTECEDENTES Y OBJETIVO

El presente trabajo fin de grado se ha llevado a cabo en el grupo de Tecnologías Ambientales y Bioprocesos del Departamento de Ingenierías Químicas y Biomolecular de la Universidad de Cantabria, y tiene como objetivo estudiar la influencia del uso de preservantes estructurales en las propiedades de transporte de nutrientes de membranas poliméricas biodegradables creadas a partir de poli- ϵ -caprolactona (PCL).

Estas membranas se elaborarán a través de la técnica inversión de fases utilizando isopropanol como baño de coagulación. La selección de este tipo de membranas procede de los resultados de trabajos previos. Se trata de membranas que garantizan el crecimiento celular, una porosidad y transporte de membrana adecuados [20, 21].

En el presente trabajo se evalúa el efecto de la utilización de agentes preservantes en las propiedades de transporte de nutrientes de membranas poliméricas PCL, siendo empleados concretamente la glicerina y el etilenglicol, conservantes ampliamente utilizados ampliamente utilizados en la conservación en seco de membranas poliméricas.

Las muestras se someterán a ensayos de análisis de flujo tangencial de agua ultrapura (UP) y de una disolución sintética de la proteína Bovine Serum Albumin (BSA) a través de la membrana. Esta configuración de flujo se ha seleccionado porque es característico del tipo de biorreactor de perfusión que se prevé en los ensayos de cultivo celular en dinámico.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 PREPARACIÓN MEMBRANAS POLIMÉRICAS

Para la obtención de las membranas utilizadas en los ensayos del presente trabajo se prepara una disolución polimérica al 15% en peso de poli- ϵ -caprolactona (PCL, “Sigma-Aldrich”, peso molecular 80000 Da) empleando como disolvente N-metil-2-pirrolidona, (“Across Organics”, extrapuro, 99%).

Para su disolución, se utiliza un agitador tipo de rodillos también conocido como “roller”, que consiste en un agitador compuesto, en este caso, por seis rodillos, los cuales gracias a su suave balanceo y movimiento de rodadura garantizan una mezcla óptima de los contenidos de la muestra. La muestra está agitando durante una semana para así conseguir la completa disolución y homogeneización de la PCL. Para facilitar la disolución del polímero se aplica calor mediante una lámpara de 230 V hasta alcanzar una temperatura de 35-37°C.



Figura 2.1. Disolución de la PCL en el disolvente con ayuda de un agitador de rodillos

Tras dejar reposar la disolución durante 24 horas y comprobar que no presenta burbujas, se lleva a cabo la obtención de las membranas planas de PCL mediante la técnica de inversión de fases.

De forma similar a trabajos anteriores [20,21], para la fabricación de las membranas de PCL es necesaria una superficie de vidrio sin imperfecciones, en la cual se extiende una pequeña cantidad de la disolución polimérica, aproximadamente 5mL para cada membrana. Con ayuda de un cuchillo o también denominado *casting knife*, previamente ajustado a una altura de 200 μm , se extiende la disolución a lo largo del vidrio.

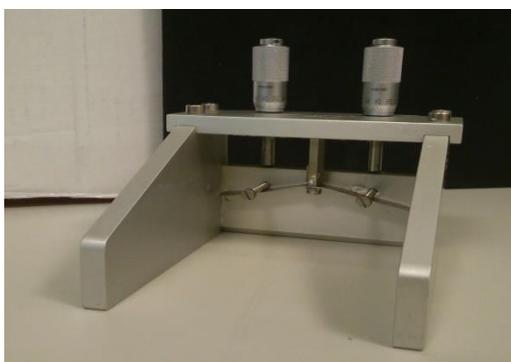


Figura 2.2. Cuchillo, casting knife.

El siguiente paso consiste en sumergir la placa de vidrio, junto con la membrana extendida, en un baño de coagulación de iso-propanol (IPA, "Oppac" pureza 99,9%) [21]. Para la formación de membranas poliméricas, frecuentemente son utilizados baños de coagulación de etanol (EtOH) ó isopropanol (IPA). En el presente trabajo se ha elegido el segundo coagulante, ya que tal y como reflejaban estudios previos [23, 24], la porosidad de la membrana es mayor en este caso. Además, la morfología de la superficie membranal indujo un crecimiento celular mayor. Como se muestra en la tabla 2.1, el crecimiento celular es mucho mayor en las membranas PCL/IPA que en las PCL/EtOH.

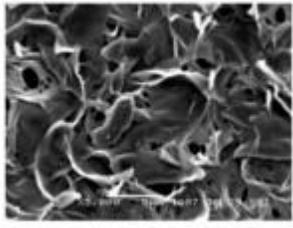
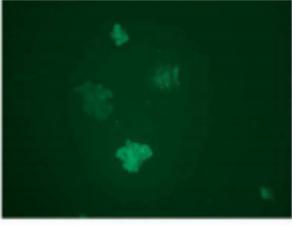
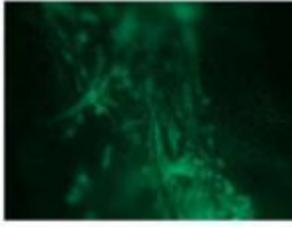
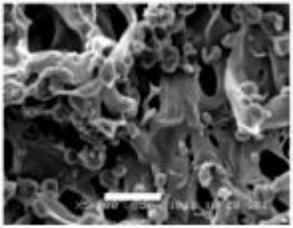
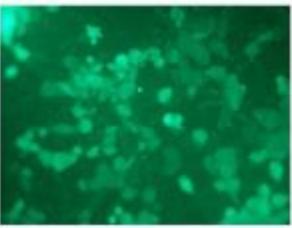
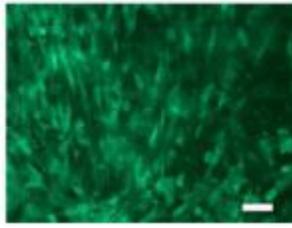
Tipo de coagulante	Imagen superficie	Crecimiento celular día 1	Crecimiento celular día 7
PCL/EtOH			
PCL/IPA			

Tabla2.1. Comparación crecimiento celular entre PCL/EtOH y PCL/IPA [24]

Este procedimiento de inversión de fase debe hacerse con sumo cuidado para evitar producir marcas en la membrana y traducirse en zonas de no uniformidad.

En cuestión de pocos minutos la disolución precipita dentro del baño de coagulación y la membrana se separa espontáneamente de la placa de vidrio. Con la ayuda de dos pinzas, la membrana se porta a un segundo baño de coagulación de igual composición que el primero, en el cual permanece 24 horas.

Posteriormente las membranas se introducen durante 48 horas en agua ultrapura (UP), cambiando el agua 3 veces al día para así eliminar restos de disolvente. De no llevar a cabo esta operación se corre el riesgo de que posibles restos de disolvente (NMP) provoquen la muerte celular en los sistemas de cultivo.

Parte de las membranas obtenidas se conservan en agua UP (PCL/UP) hasta llevar a cabo los ensayos de caracterización de flujo. El resto de las membranas se llevan a baños de 2 preservantes diferentes: glicerina (Glycerol "Calbiochem" densidad 1.2619 g/ml, pureza 99.87%.) y etilenglicol (Ethylene Glycol PRS, "Panreac" peso molecular 62.07 g/mol,

pureza 99%) al 25% v/v agua/preservante. Las membranas se mantienen en los baños de preservante durante 24 horas tras las que se sacan y dejan secar en condiciones ambientales. Las membranas con preservante se denominarán PCL/Gly para aquellas sumergidas en glicerina y PCL/EtG para aquellas sumergidas en etilenglicol.

Antes de someterlas al experimento de caracterización de propiedades de transporte de nutrientes se lleva a cabo la limpieza de dichas membranas con el fin de eliminar el preservante. Este proceso consiste en sumergir las membranas en agua UP durante las 24 horas previas al ensayo de caracterización.

La caracterización de las membranas consiste en la medida del espesor utilizando un micrómetro electrónico "Standard, Mitutoyo, Serie 293" y determinación de la porosidad mediante método gravimétrico usando *ShellSol* como líquido penetrante.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES DE TRANSPORTE DE NUTRIENTES A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS

Las figuras 2.3 y 2.4 muestran el equipo flujo tangencial utilizado para caracterizar las propiedades de transporte de nutrientes de las membranas de PCL objeto de estudio del presente trabajo.

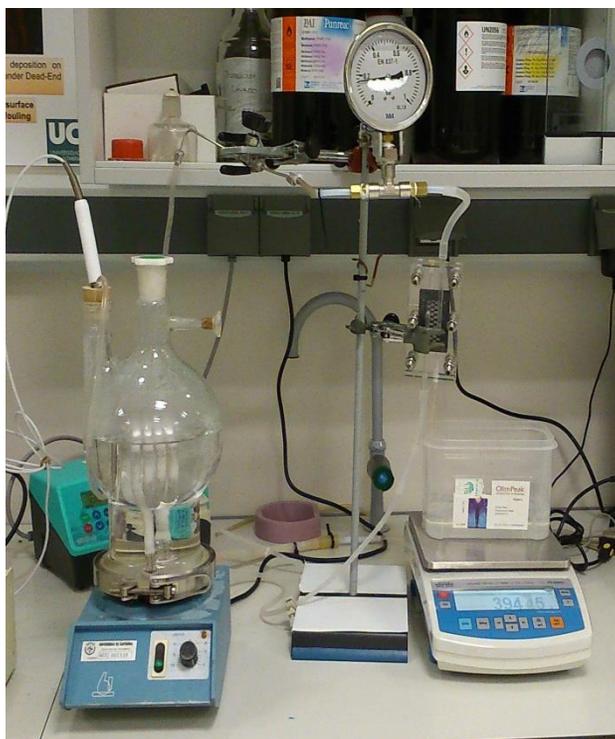


Figura 2.3. Equipo de caracterización de permeabilidad de nutrientes de las membranas en configuración de flujo tangencial.

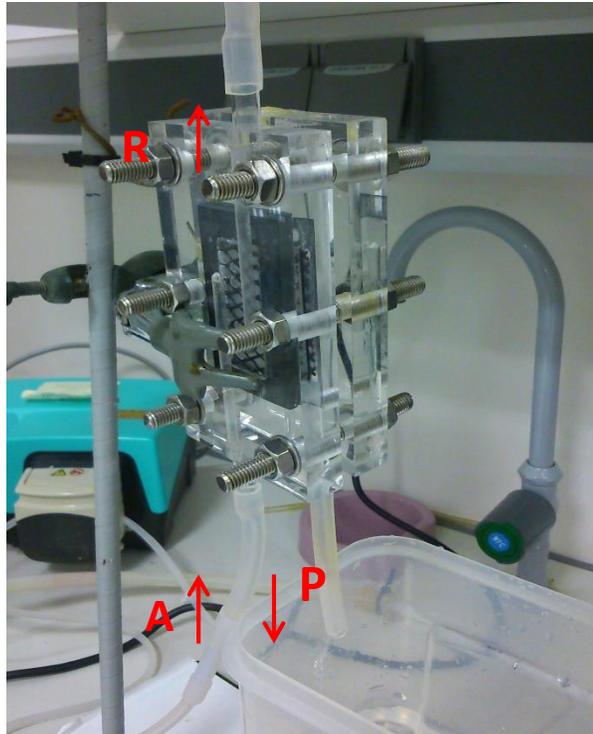


Figura 2.4. Detalle de la celda de la membrana del equipo de flujo tangencial. “A” indica la circulación de la fase Alimentación. “P” indica la salida del permeado y “R” el retorno de la fase Rechazo al tanque de alimentación.

El sistema consiste en un tanque de alimentación con una resistencia eléctrica que permite ajustar la temperatura de la alimentación a aproximadamente 37°C, temperatura de trabajo en una incubadora de crecimiento celular. Dicho parámetro es monitorizado con un termopar (*P. Selecta*). La alimentación se circula a un caudal de 160 mL/min a través del sistema mediante una bomba peristáltica (*Watson Marlow, 323*). La membrana con un área efectiva de 10 cm² se introduce en la celda mostrada en la figura 4. La presión a través de la membrana se ajusta mediante una válvula de aguja (*MeI*) y se monitoriza mediante un manómetro.

Para caracterizar el flujo de permeado a través de la membrana se toman datos de caudal de permeado a lo largo del tiempo. Se utiliza una balanza de precisión “*Radwag PS 6000/X*”, y se registran gramos acumulados a cada minuto mediante el programa “*Pomiar*”, que proporciona los resultados de la forma mostrada en la figura 2.5:

Lp	Fecha	Contador	Masa	Jm	Nota
1	25/11/2015	0	80.6 g		P= 0.16 bar
2	25/11/2015	61	150.35 g		
3	25/11/2015	122	217.44 g		
4	25/11/2015	183	283.56 g		
5	25/11/2015	244	344.05 g		
6	25/11/2015	305	402.6 g		
7	25/11/2015	366	460.18 g		
8	25/11/2015	426	515.28 g		
9	25/11/2015	487	567.32 g		
10	25/11/2015	548	619.6 g		
11	25/11/2015	609	671.16 g		

Figura 2.5. Recogida de datos automatizada a partir de los que determinar el flujo de permeado

-Caracterización de flujo de agua ultrapura (UP)

Para la caracterización de la permeabilidad hidráulica de las membranas se hace circular agua UP como alimentación a 37°C en el sistema de flujo tangencial y se fijan diferentes presiones transmembranales durante un periodo de tiempo determinado según la secuencia.

Se fija una presión de 0.16 bares durante una hora y media, tiempo suficiente para que el flujo se estabilice. Al principio del ensayo (P=0.16 bares) el flujo de agua que atraviesa la membrana es mucho mayor respecto a los últimos minutos del proceso. Paulatinamente la membrana sufre una compactación, que se traduce en una disminución de flujo hasta alcanzar el estado estacionario, zona de referencia para conocer la permeabilidad de la membrana probada.

Para determinar la existencia o no de compactación de la membrana, se determina el factor de caída de flujo (FC) que se define como la caída de flujo desde el inicio del ensayo hasta que se alcanza la estabilización de la membrana a 0.16 bares, es decir, la primera hora y media de experimentación. Su valor se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$FC = 1 - \frac{JW_{ss}}{JW_o} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde FC_{ss} es el flujo de agua en estado estacionario (L/m²h) y FC_o el flujo de agua inicial (L/m²h).

Posteriormente se varían los intervalos de presión y se mide el flujo a cada uno de éstos durante 20 minutos. Se lleva a cabo desde la mínima presión, 0.04 bares, hasta la máxima, 0.16 bares, pasando por los valores 0.08 y 0.12 (subida). La prueba finaliza tras realizar el mismo procedimiento de forma inversa, es decir, desde la máxima presión, a la mínima (bajada).

Tras obtener los datos de caudal de permeado a cada una de las presiones transmembranales, se calcula el flujo de permeado a partir del área de membrana, 10 cm². La determinación de éste se obtiene a partir de la ecuación de flujo:

$$Jw = Kw \cdot \Delta P \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde:

Kw es la permeancia del agua de la membrana (L/m² h bar)

J_w es el flujo de permeado ($L/m^2 h$)

ΔP es la presión transmembranal (bar).

La permeancia K_w ($L/m^2 h bar$) de la membrana corresponde con la pendiente de la recta obtenida tras representar el flujo frente a la presión.

Una vez conocidos los flujos de cada uno de los ensayos, se adimensionalizan para ser representados a lo largo del tiempo. La adimensionalización sigue la siguiente ecuación:

$$JW_{adim} (\cdot) = \frac{J_{wt}}{J_{w_0}} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Siendo J_{wt} el flujo de permeado a cada valor de tiempo ($L/m^2 h$) y J_{w_0} ($L/m^2 h$) el valor de flujo de permeado al inicio del ensayo (valor máximo).

-Caracterización de transporte de disolución modelo de BSA

El segundo procedimiento consiste en la caracterización de flujo de nutriente, para lo cual se utiliza la proteína *Bovine Serum Albumin* (BSA, Sigma Aldrich, A9647. Faction V, $p \geq 96\%$, tamaño de partícula $14 \times 4 \times 4$ nm, peso molecular 67 kDa), proteína ampliamente utilizada en medios de crecimiento para cultivos de células y tejidos. A partir de ésta se realizaron disoluciones 0,4 g/L de BSA en disolución tampón de PBS, a $pH=7.4$

La disolución tampón de PBS se obtiene la disolución en agua destilada de los siguientes compuestos disueltos en agua destilada:

8 gramos de cloruro sódico (NaCl, Panreac, peso molecular 58,44 g/mol, pureza 99,5%)

0.24 gramos de dihidrógeno fosfato potásico (KH_2PO_4 , Panreac, 136,9 g/mol, pureza 99%)

0.2 gramos de cloruro potásico (KCl, Panreac, peso molecular 74,56 g/mol, pureza 99.5%)

1.44 gramos de hidrógeno fosfato disódico (HNa_2O_4P , Sigma-Aldrich, peso molecular 141,96 g/mol, pureza 99%)

Una vez obtenida la disolución tampón PBS se controla su pH, (pHmetro “Crison 25”) valor que debe estar en torno a 7.4, el óptimo para garantizar las condiciones de cultivo celular. Tras esta medida se añade la proteína BSA y, debido a la formación de espumas, la disolución se deja reposar en la nevera la noche anterior al ensayo.

Los ensayos para la caracterización de transporte de nutriente tienen una duración de 8 horas, tiempo en el cual se dan dos condiciones de ensayo diferentes. Inicialmente las membranas son sometidas durante las primeras 4 horas a un proceso de filtración tangencial de agua Upa 37 °C y a presión constante de 0.16 bares. Igualmente se toman medidas de volumen de permeado (L) a lo largo del tiempo (h), para posteriormente conocer el flujo de permeado (L/m²h).

Transcurrido este tiempo el contenido del tanque de alimentación se cambia por la disolución modelo BSA previamente atemperada a 37 °C. Durante las 4 horas restantes se somete a la membrana a un flujo tangencial de dicha disolución a presión constante de 0.1 bares, la más habitual en biorreactores de perfusión. Por un lado se toman medidas de caudal de permeado (L/h), valor que dividido entre el área de filtración (m²) de cada sistema experimental (10 cm²), se obtiene el flujo total de permeado J_T (L/m² h). A partir de estos datos se calcula la permeabilidad total K_T de disolución de BSA (L/m² h bar), mediante la siguiente ecuación de flujo:

$$J_T = K_T \cdot \Delta P \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Por otro lado, durante estas 4 últimas horas se toman muestras periódicamente, de alrededor de 3 mL, tanto del flujo de permeado, retenido como del tanque de alimentación, para su posterior medida de concentración BSA. Para llevar a cabo esta medición se utiliza un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (UV-1800, Shimadzu) a una longitud de onda de 280 nm. Previamente a la medida de estas muestras, se realiza una recta de calibrado a partir de diferentes concentraciones, concretamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2 y 0,4 g/L de BSA en agua destilada (Figura 2.6):

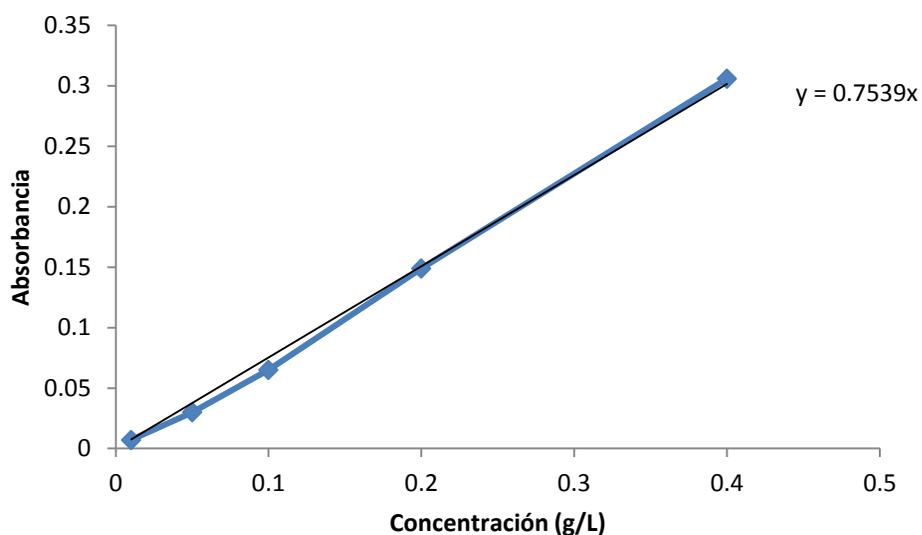


Figura 2.6. Ejemplo recta de calibrado a partir de los valores de absorbancia de las diferentes concentraciones BSA.

La pendiente de esta recta es necesaria para conocer los valores de concentración (g/L) de BSA tanto de la alimentación, permeado como retenido.

$$\text{Concentración permeado (g/L)} \quad CP = \frac{\text{Absorbancia permeado}}{\text{Pendiente recta calibrado}} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

$$\text{Concentración alimentación (g/L)} \quad CT = \frac{\text{Absorbancia alimentación}}{\text{Pendiente recta calibrado}} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

$$\text{Concentración retenido (g/L)} \quad CR = \frac{\text{Absorbancia retenido}}{\text{Pendiente recta calibrado}} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Conocida la concentración de BSA en el permeado, se calcula el flujo de BSA, J_{BSA} (g m² h), en el permeado mediante la siguiente expresión:

$$J_{BSA} = J_T \cdot c_p \quad \text{Ecuación 2.8}$$

Mediante el valor del J_{BSA} en el permeado, se obtiene también, la permeancia de BSA, K_{BSA} (L/m² h bar), mediante la ecuación:

$$J_{BSA} = K_{BSA} \cdot \Delta P \quad \text{Ecuación 2.9}$$

Finalmente, conocidas las concentraciones de BSA tanto de tanque de alimentación, C_T (g/L), como la concentración del permeado, C_P (g/L), se calcula el rechazo (R) de BSA (%) a través de la ecuación:

$$R = \frac{C_T - C_P}{C_T} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.10}$$

Se llevará a cabo un análisis estadístico de los datos obtenidos. Las membranas PCL/Gly y PCL/EtG serán comparados respecto a los resultados de las PCL/UP mediante el análisis *t de Student*, con probabilidad menor al 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el estudio tanto de caracterización de flujo de agua UP, como la caracterización de transporte de nutriente de la disolución modelo de BSA, se utilizaron los 3 tipos de membranas, PCL/UP, PCL/Gly y PCL/EtG. Cada uno de los ensayos fue llevado a cabo dos veces y los resultados mostrados son fruto de los valores promedio para cada tipo de PCL, además de una desviación estándar.

-Espesor y porosidad de la membrana

Previamente a la caracterización de flujo de agua UP, se mide el espesor (δ) para cada tipo de membrana utilizando un micrómetro electrónico “Standard, Mitutoyo, Serie 293”. Por otro lado se llevó a cabo la medición de la porosidad de la membrana (ϵ) mediante el método gravimétrico [21], siguiendo la ecuación 3.1:

$$\epsilon = \frac{(W_1 - W_2) \cdot \rho_d}{[(W_1 - W_2) \cdot \rho_d + W_2 \cdot \rho_{PCL}]}$$

Ecuación 3.1

Siendo W_1 el peso de la membrana húmeda (g), W_2 el peso de la membrana seca (g), ρ_d la densidad del disolvente, en este caso *ShellSol* (0.821 g/cm^3) y ρ_{PCL} la densidad de la PCL (1.145 g/cm^3 , Sigma Aldrich).

En referencias anteriores, para la medición de la porosidad, se utilizaron como disolventes isopropanol y queroseno. En el presente trabajo se utiliza el disolvente *ShellSol* el cual es similar al queroseno pero en comparación con las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), *ShellSol* aporta datos más exactos. La tabla 3.1 muestra los valores medios de dichos parámetros, tanto espesor como porosidad.

Membranas PCL	
Espesor (δ) (μm)	83.66 ± 3.87
Porosidad (ϵ) (%)	80.7 ± 0.93

Tabla 3.1. Espesor y porosidad promedia para membranas PCL

CARACTERIZACIÓN FLUJO DE AGUA UP

Como previamente se ha detallado en la metodología experimental, con el fin de caracterizar el flujo de agua UP se somete a cada tipo de membrana a un sistema de flujo tangencial de agua UP a 37°C durante 4 horas, tiempo en el que se modifican los valores de presión y se determina el flujo a cada uno de éstos.

La siguiente figura 3.1 representa los valores de flujo adimensional de agua UP frente al tiempo, o recogidos para las PCL/UP en cada intervalo de presión.

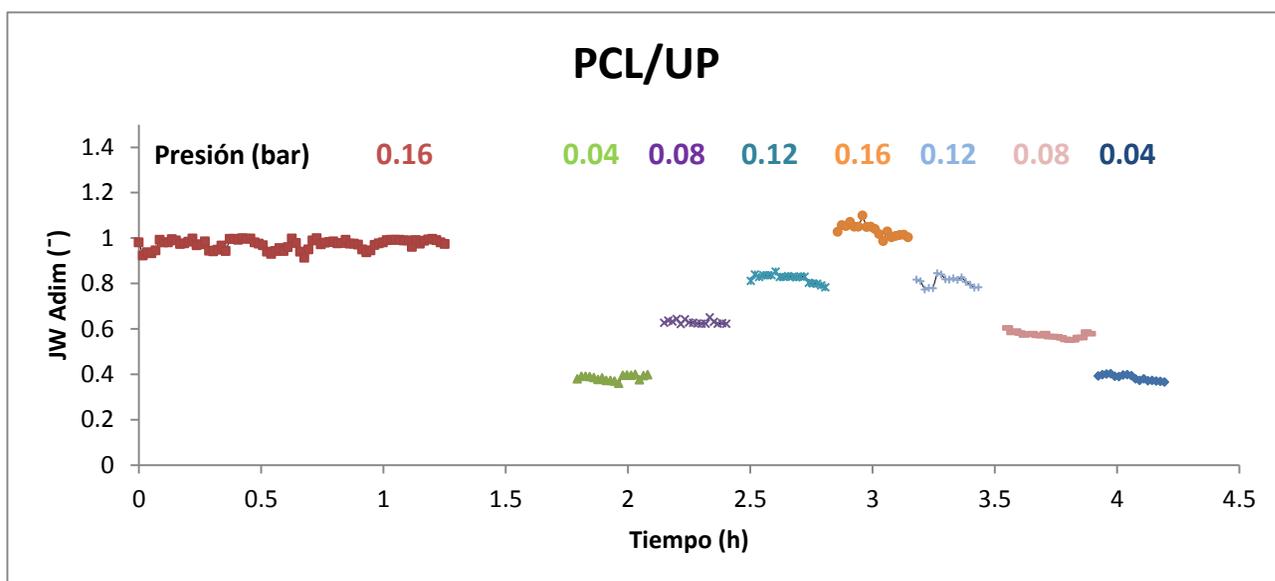


Figura 3.1. Evolución característica del flujo adimensional de agua UP para membranas PCL/UP para cada intervalo de presión transmembranal (0.04-0.16 bar)

Como queda representado, para cada valor de presión el flujo se mantiene constante. Los valores de flujo más elevados coinciden con las presiones transmembranales más altas (P=0.16 bar) y viceversa. Para la mínima presión del ensayo (P=0.04 bar) se dan los valores más bajos de flujo. Este fenómeno se da tanto en el periodo de subida como en la bajada de presiones.

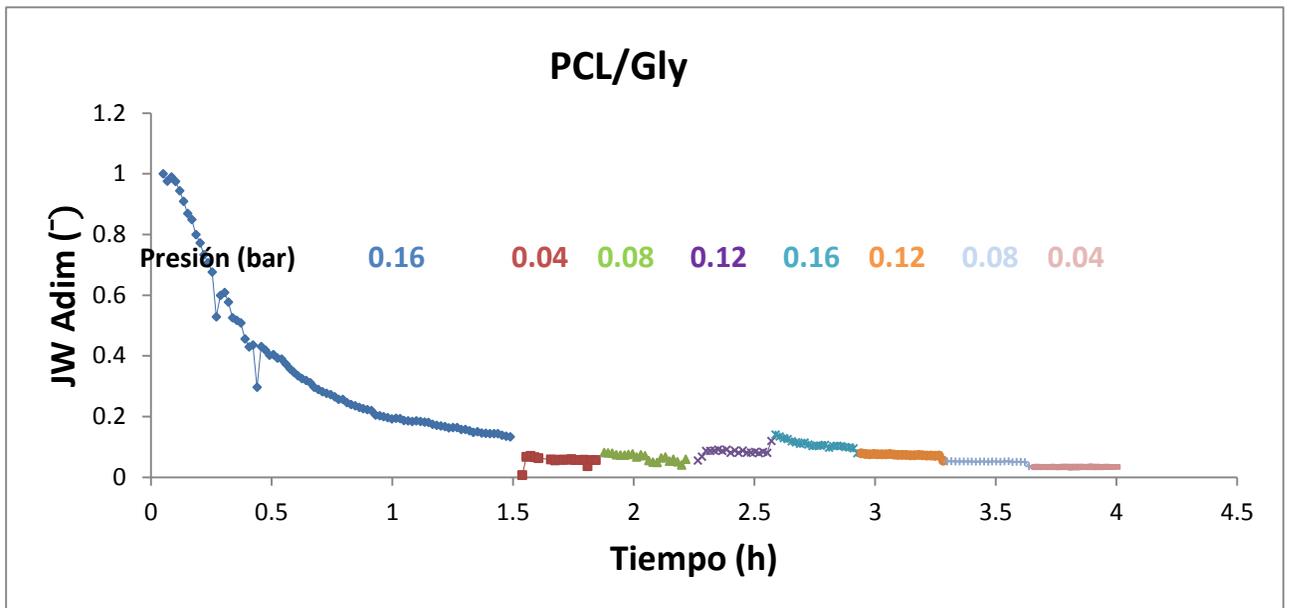


Figura 3.2. Evolución característica del flujo adimensional de agua UP para membranas PCL/Gly para cada intervalo de presión transmembranal (0.04-0.16 bar)

Para el caso de la membrana PCL/Gly representada en la figura anterior, figura 3.2, se observa una caída de flujo inicial muy acusada y tras aproximadamente 1 hora y media de ensayo, se alcanza un estado estacionario.

De nuevo en este caso, para cada valor de presión transmembranal se obtienen trayectorias de flujos constantes y coincidentes entre los flujos a iguales presiones en sentido ascendente y descendente.

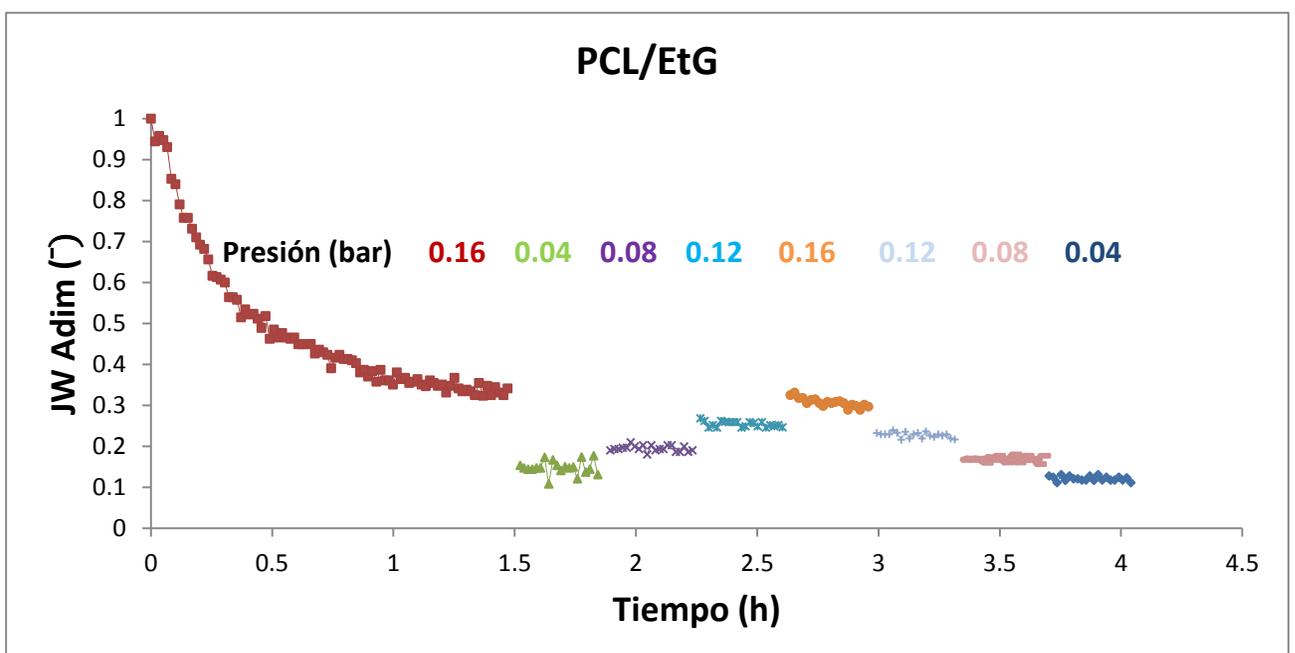


Figura 3.3. Evolución característica del flujo adimensional de agua UP para membranas PCL/EtG para cada intervalo de presión transmembranal (0.04-0.16 bar)

Por último, la figura 3.3 representa el comportamiento del flujo adimensional de agua UP correspondiente a la membrana PCL/EtG. Una vez más cabe destacar la caída de flujo producida durante la primera hora y media del ensayo hasta alcanzar el estado estacionario, pero este caso no es tan pronunciada como ocurre con las PCL/Gly. Los demás valores de flujo siguen las tendencias anteriores, siendo coincidentes a iguales intervalos de presión.

A partir de los valores de flujo iniciales y en estado estacionario se determina la caída de flujo FC de las 3 membranas de acuerdo a la ecuación 2.1. La figura 3.4 hace referencia a los valores de flujo iniciales JW_0 (L/m^2h):

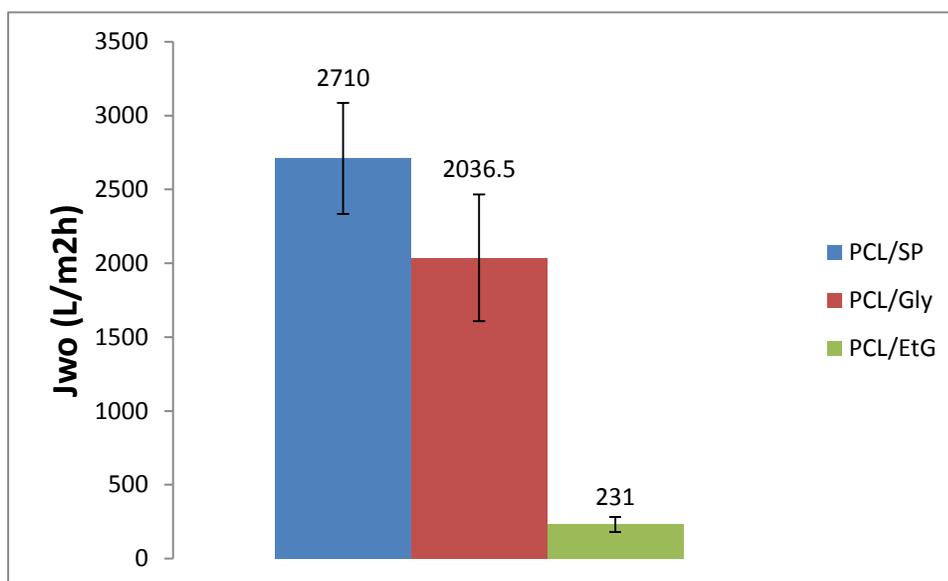


Figura 3.4. Flujo inicial para cada tipo de PCL

La membrana PCL/UP muestra el valor de flujo inicial más elevado (2710 ± 376), significativamente diferente tanto al de la PCL/Gly (2036 ± 429) como a las membranas PCL/EtG (231 ± 51).

Lo mismo ocurre si tenemos en cuenta el flujo de agua UP en estado estacionario, JW_{ss} (L/m^2h), pasada la primera hora y media de proceso (0.16 bares). Las membranas PCL/UP de nuevo alcanzan el mayor valor (2696 ± 372), las PCL/Gly muestran un flujo un orden de magnitud menor al inicial (264 ± 41) sufriendo una caída de flujo muy pronunciada y por último las PCL/EtG también sufren caída de flujo pero en menor medida que las anteriores (84 ± 26). Ambos datos presentan diferencias significativas respecto a los de las PCL/UP. Estos datos son acordes a las figuras 3.1, 3.2 y 3.3 mostradas anteriormente.

A partir de dichos valores de flujo tanto inicial como en estado estacionario, se determina la caída de flujo para cada una de las membranas y así poder conocer la posible compactación o no de éstas. La figura 3.5 muestra dichos valores resultando ser la membrana PCL/Gly la que, como ya se ha explicado anteriormente, más caída de flujo sufre ($86\% \pm 0.7$), seguido de la membrana PCL/EtG ($64\% \pm 3.3$) ambas por encima de la

membrana PCL/UP que no presenta caída de flujo. Dichos valores promedio de caída de flujo de las PCL/Gly y PCL/EtG de nuevo suponen diferencias significativas respecto a las PCL/UP.

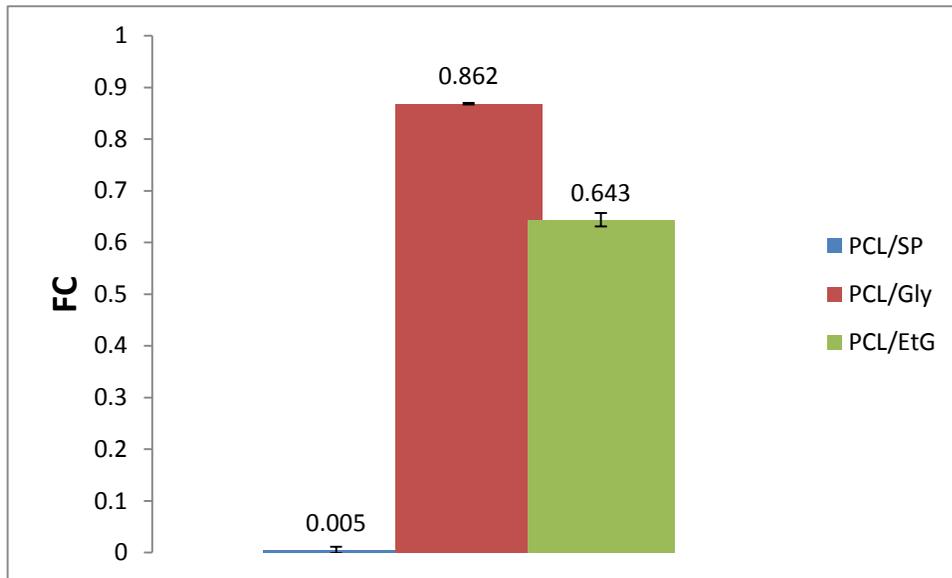


Figura 3.5. Caída de flujo promedio (FC) sufrida por las membranas según el uso del tipo de preservante.

La figura 3.6 representa el flujo promedio de agua UP para cada uno de los valores de presión transmembranal fijados, tanto en el periodo de subida como bajada de ésta.

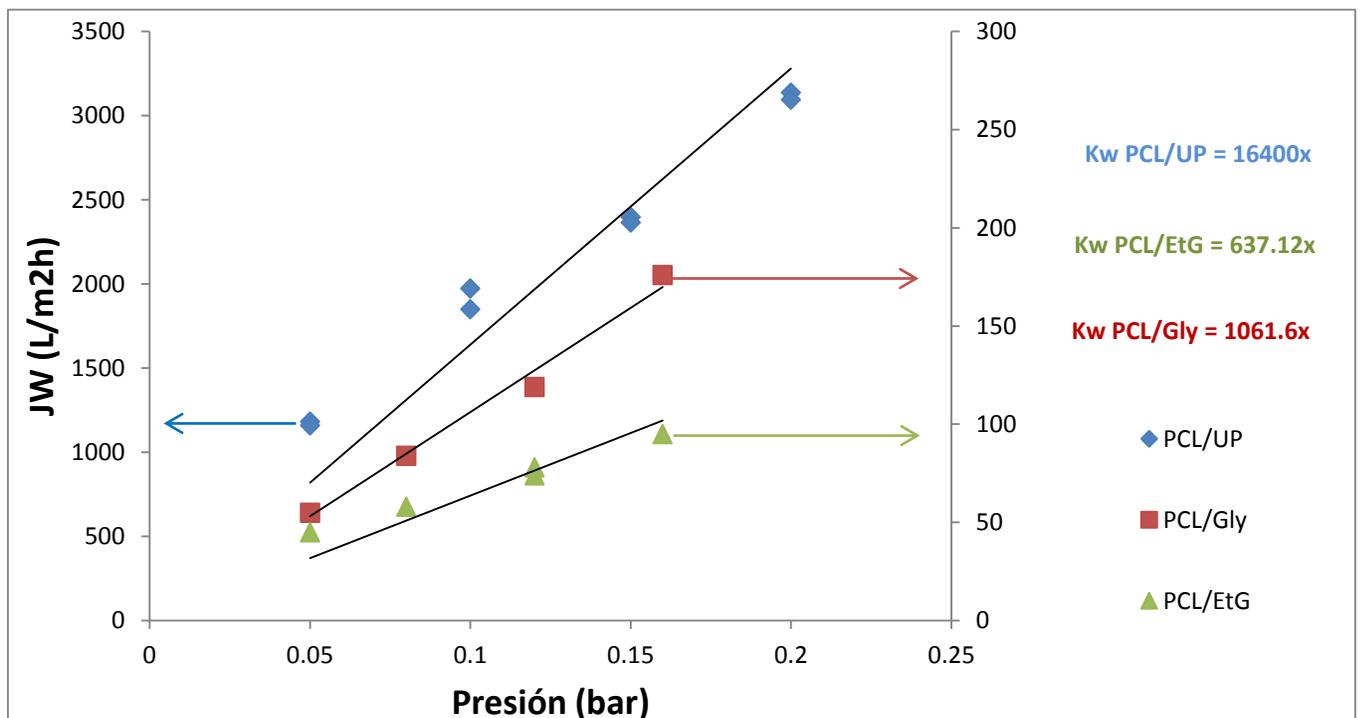


Figura 3.6. Representación de la relación de las presiones transmembranales de membranas representativas de PCL/UP, PCL/Gly y PCL/EtG. Flujo de agua UP para cada valor de presión (subida y bajada)

A partir de las pendientes de la figura 3.6 se obtienen los valores de permeancia (L/m²hbar) para cada tipo de membrana, respectivamente.

A continuación, la figura 3.7 muestra dichos valores promedio y desviación estándar de permeancia para cada PCL.

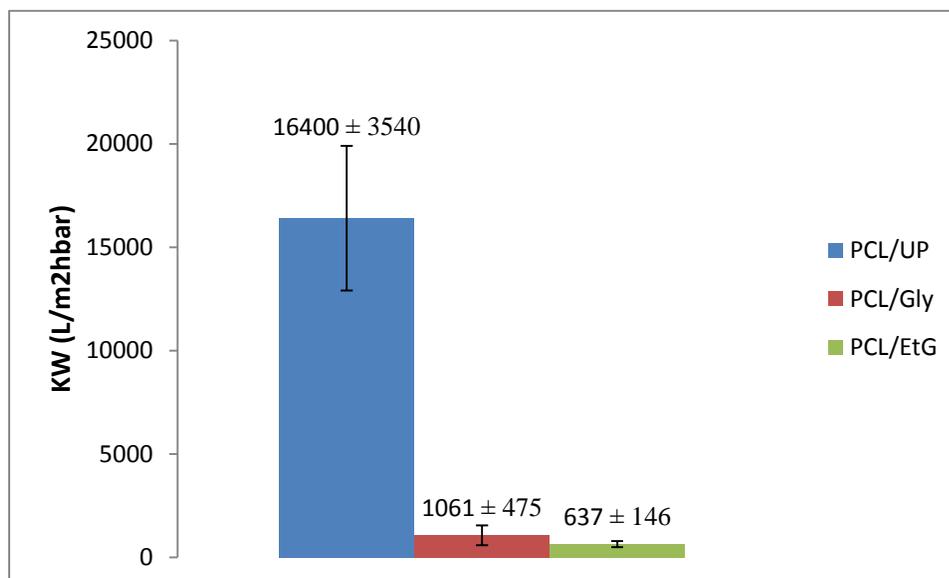


Figura 3.7. Permeancia promedio o en estado estacionario para cada tipo preservante en las membranas de PCL

Cabe destacar la significativa diferencia existente entre las membranas PCL/UP (16400 ± 3540 (L/m²hbar)) respecto a las PCL/Gly (1061 ± 475 (L/m²hbar)) y PCL/EtG (637 ± 146 (L/m²hbar)). Estos resultados guardan estrecha relación con las caídas de flujo para cada tipo de PCL.

Los valores de la PCL/Gly han resultado ser un orden de magnitud mayor a los obtenidos en trabajos previos [21] (268 ± 33 (L/m²hbar)). Ésta comparativa respecto a resultados anteriores es orientativa, ya que en dicho trabajo previo no se llevó a cabo control del pH y la temperatura del ensayo era la ambiente. El valor promedio del presente trabajo (1061 ± 475) proviene de la caracterización de flujo de agua UP de las membranas PCL/Gly. Ambos ensayos procedían de la misma membrana. Sin embargo, no se han comprobado en otras membranas del mismo batch. Esta diferencia respecto a los valores de trabajos anteriores [21], se ha atribuido a que la elección de la membrana pudiera ser no representativa.

-Comprobación de protocolo de limpieza

Los datos conocidos hasta el momento no dan información suficiente acerca del efecto de los preservantes en las membranas. Es necesario comprobar si la limpieza previa (con

agua UP) es suficiente para retirar el preservante o si el preservante influye en la estructura mecánica de la membrana. Es por ello por lo que se somete a las PCL a un nuevo protocolo de limpieza con condiciones más exigentes, utilizando concretamente etanol, compuesto mucho más afín a la glicerina y al etilenglicol.

Para el protocolo de limpieza, se sumergen las membranas con preservantes durante 24 horas previas a su estudio, en un baño de etanol con el fin de eliminar el preservante que pueda estar presente y se completa con una operación de filtración tangencial de una disolución al 50% v/v de etanol en agua ultra pura a 37°C y a 0.16 bar.

Para comprobar la eficacia de la limpieza del etanol, se vuelven a evaluar las propiedades de transporte mediante un sistema de flujo tangencial. Inicialmente el tanque de alimentación contiene una disolución 50% etanol (*“Oppac”* grado alcohólico 99.89% vol) en agua UP a 37°C, filtración que se lleva a cabo durante una hora a 0.16 bar. Transcurrido este tiempo, el tanque de alimentación se cambia a agua UP y se somete a las membranas de PCL/Gly y PCL/EtG a 3 horas de filtración de agua UP a 37°C y de nuevo 0.16 bar. Las figuras 3.8 y 3.9 muestran las caídas de flujo de las membranas PCL/Gly y PCL/EtG respectivamente.

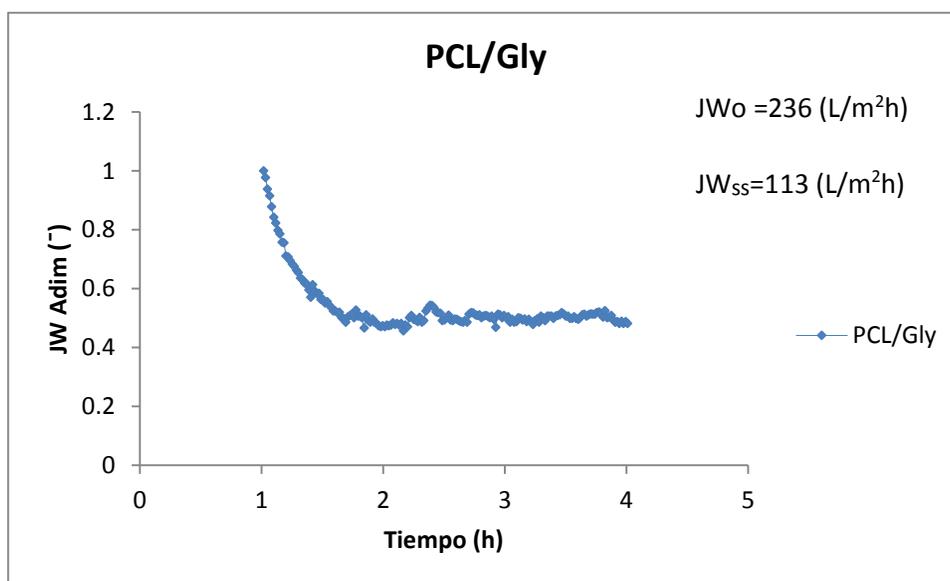


Figura 3.8. Caída de flujo de agua PCL/Gly en el ensayo de etanol

La caída de flujo en este caso (PCL/Gly) es del 52 %, mucho menor al experimento inicial cuya limpieza consistía sólo en agua UP, en el que el flujo cae un 86%. Haciendo referencia y comparando los flujos iniciales de ambos ensayos, es decir, caracterización de agua UP previa y caracterización de agua UP tras el lavado en etanol, el primero de ellos presenta un flujo promedio de agua UP de 2036 L/m²h, frente al segundo, cuyo flujo inicial es de 236 L/m²h.

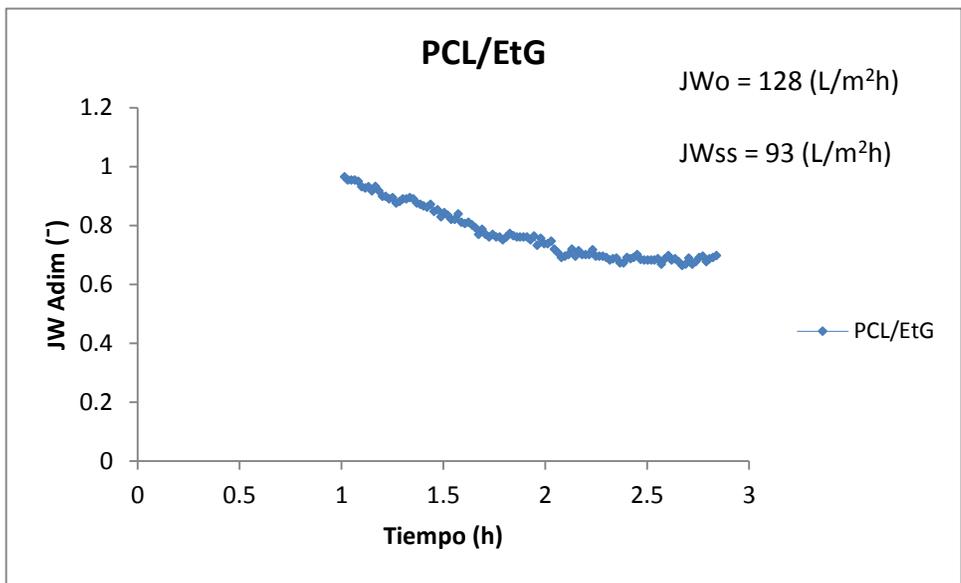


Figura 3.9. Caída de flujo de agua PCL/EtG en el ensayo de etanol

Por su parte la PCL/EtG, tras el lavado previo en etanol, presenta una caída de flujo de agua UP de un 27% frente a un 64% del ensayo inicial con lavado en agua UP. En este caso el flujo inicial es de 128 L/m²h frente al primer ensayo, 231 L/m²h.

Sería de esperar que el etanol provocara un aumento de la permeabilidad membranal [22], ya que éste hidrofaliza la membrana y hay estudios que observan una degradación de membranas de PCLa sometidas a una esterilización al 50% v/v en etanol durante 30 minutos, que provoca un aumento de las propiedades de transporte de agua respecto a las membranas sin esterilizar. Por ello flujo que pasa a través de ella debería ser mayor. Las figuras 3.10 y 3.11 muestran una comparativa de las permeancias en función del protocolo de lavado inicial.

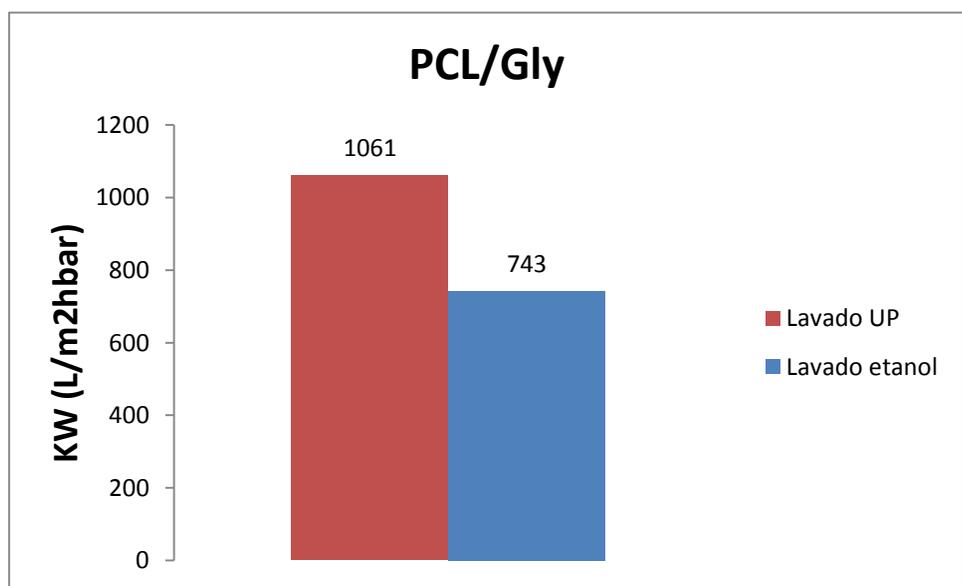


Figura 3.10. Comparativa de permeancias en agua UP para membranas PCL/Gly en función de su protocolo de lavado.

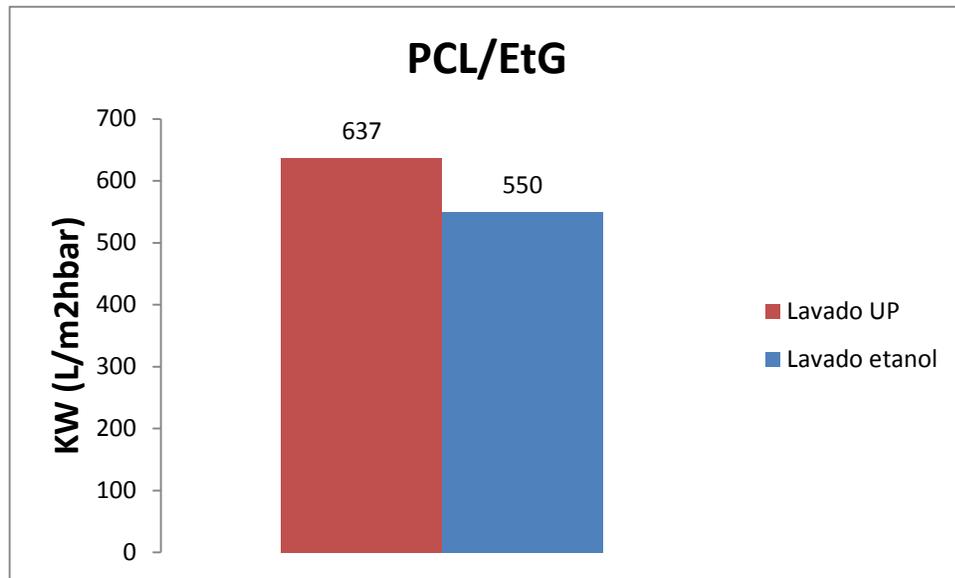


Figura 3.11. Comparativa de permeancias en agua UP para membranas PCL/EtG en función de su protocolo de lavado.

Contrariamente a lo esperado [22], el previo lavado en etanol no proporciona valores de permeancia mayores tras la caracterización de flujo de agua UP. Por lo tanto el tipo de limpieza no influye en la eliminación de los preservantes en las membranas de forma concluyente, y sí es posible, que incluso reduzca las propiedades de transporte.

Por tanto, los fenómenos de caída de flujo observados al utilizar preservantes no parecen asociados con la presencia de preservante aún en la membrana. No es determinante para conocer la influencia de los preservantes en las membranas, ya que a pesar de que las caídas de flujo son menores tras del lavado con etanol, los flujos iniciales de agua UP en estos ensayos son muy bajos.

CARACTERIZACIÓN TRANSPORTE DE NUTRIENTE DE LA DISOLUCIÓN MODELO DE BSA

Como se ha explicado anteriormente en la metodología, para llevar a cabo la caracterización de transporte de nutriente de la disolución BSA, se somete a cada tipo de membranas a ensayos cuya duración son 8 horas. Durante las 4 primeras horas, éstas son sometidas de nuevo a un flujo tangencial de agua UP a 37°C a una presión constante de 0.16 bares hasta la estabilización. Transcurridas estas 4 horas las mismas membranas son sometidas a un sistema de flujo tangencial de disolución modelo de BSA a una presión constante de 0.1 bares precalentada a 37°C. Las figuras 3.12, 3.13 y 3.14 muestran la evolución con el tiempo para cada membrana en las dos partes del experimento descritas.

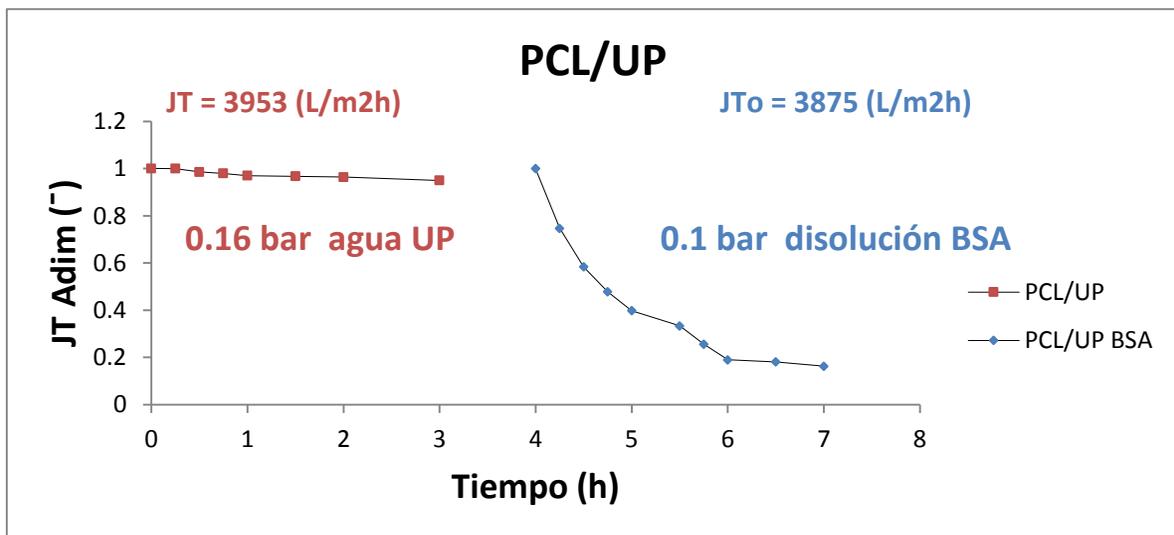


Figura 3.12. Evolución con el tiempo de la membrana PCL/UP para los ensayos de filtración de agua UP y disolución de BSA

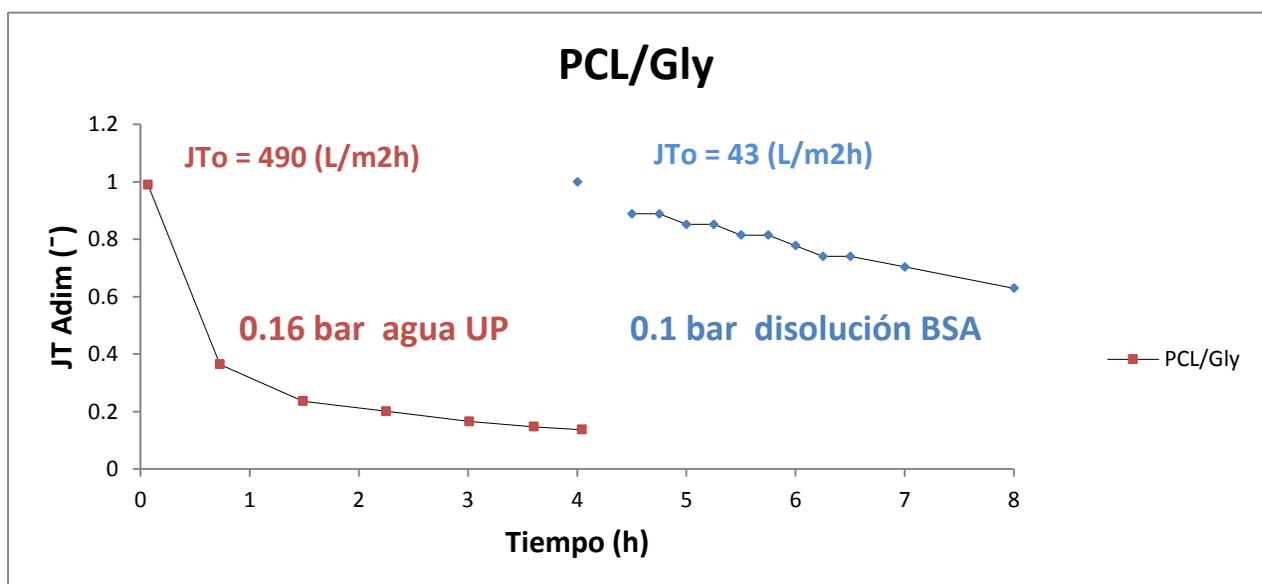


Figura 3.13. Evolución con el tiempo de la membrana PCL/Gly para los ensayos de filtración de agua UP y disolución de BSA

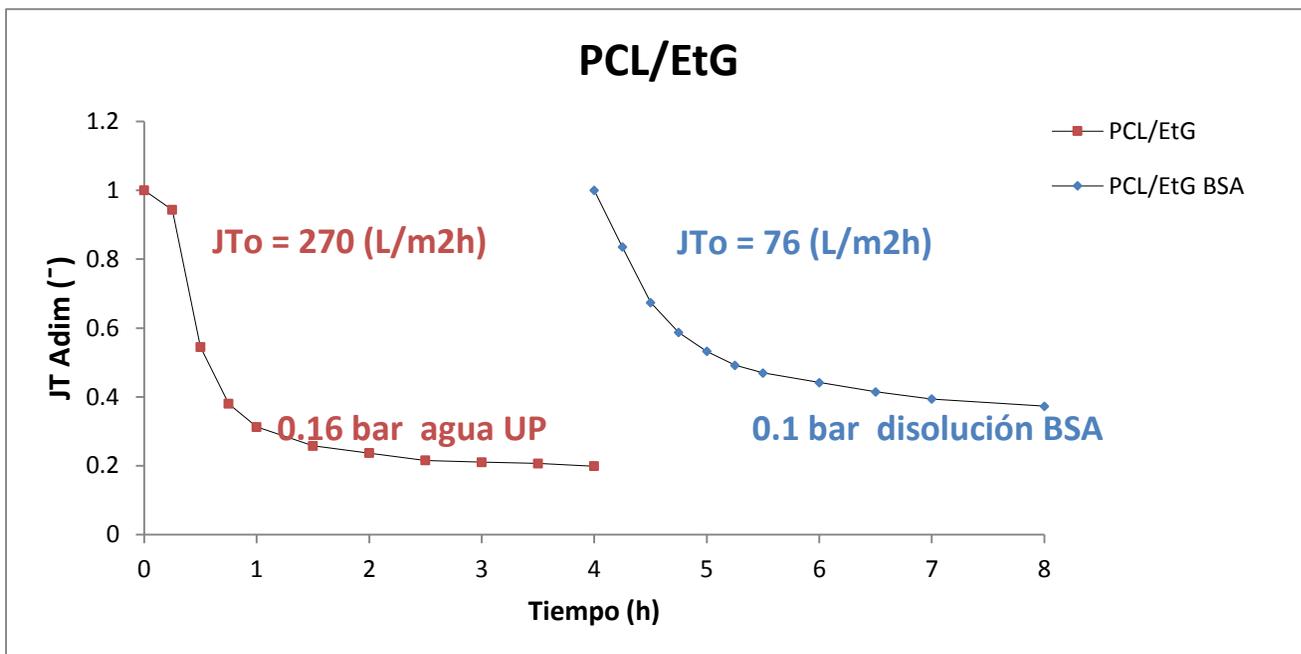


Figura 3.14. Evolución con el tiempo de la membrana PCL/EtG para los ensayos de filtración de agua UP y disolución de BSA

El comportamiento de las membranas es idéntico al observado en la caracterización de flujo de agua UP en el que se variaban las presiones transmembranales. Las PCL/UP no presentan caída de flujo inicial, consistente con los resultados anteriores, mientras que las PCL/EtG ($79\% \pm 4.2$) y la PCL/Gly ($85\% \pm 4.2$) tienen unas caídas de flujo respectivamente de forma análoga a los resultados anteriores de flujo de agua UP.

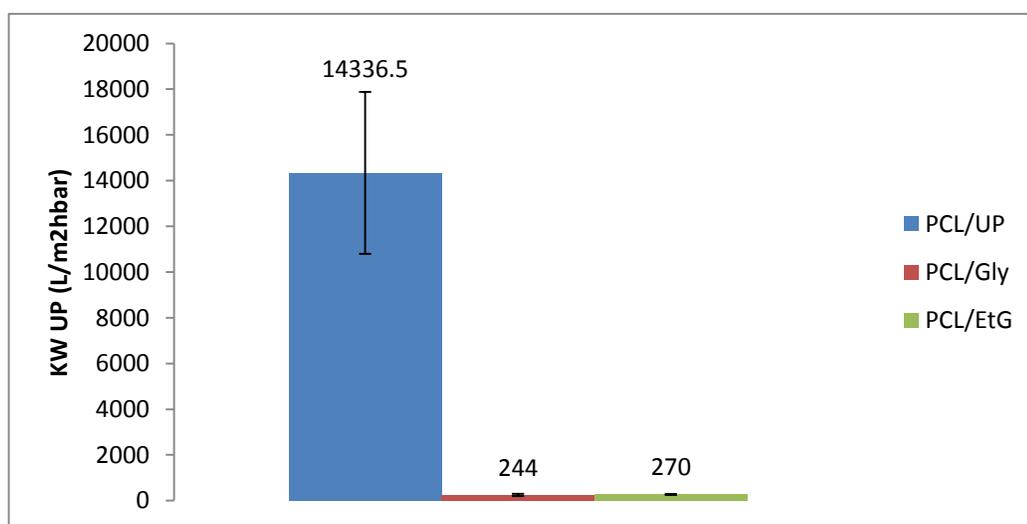


Figura 3.15. Permeancias (L/m²hbar) promedio de agua UP para cada tipo de membrana

A partir de los datos de flujo de agua UP, si se tiene en cuenta la presión constante a la que se lleva a cabo el presente ensayo (0.16 bares) se obtiene la permeancia de agua UP (L/m²hbar) para cada uno de los casos ensayados. La figura 3.15 proporciona las diferentes permeancias de flujo de agua UP obtenidas, siendo la permeancia de las PCL/UP (14336 ± 3538 (L/m²hbar)) dos órdenes de magnitud superior a las membranas

PCL/Gly (244 ± 50 (L/m²hbar)) y PCL/EtG (270 ± 5 (L/m²hbar)), valores significativamente diferentes.

Las membranas de PCL/UP y PCL/EtG vuelven a mostrar valores de permanencia similares a los ensayos de flujo de agua UP. Sin embargo, para la PCL/Gly se obtiene un valor de permeancia promedio de agua UP de 1061 (L/m²hbar) en los ensayos preliminares, mientras que en estos ensayos la permeancia promedio de flujo de agua UP ha sido de 244 L/m²hbar. Estos datos son más semejantes a los reportados en estudios anteriores (268 ± 33 (L/m²hbar)). Por lo tanto, la hipótesis inicial de que las membranas PCL/Gly ensayadas inicialmente no eran representativas cobra veracidad.

Haciendo referencia a la caracterización de transporte de nutriente de disolución de BSA, el motivo por el cual este proceso de estabilización dura 4 horas es porque en trabajos previos [21] en los que se realizaban ensayos de 10 horas, queda registrado que alrededor de las 4 horas de ensayo se alcanza el estado estacionario.

Dicho tiempo de proceso está representado en las figuras 3.12, 3.13 y 3.14, y se puede suponer que las membranas sufren un paulatino ensuciamiento interno de los poros de la membrana o también conocido como *fouling*, lo cual tiene gran influencia en el flujo total, ya que lo reduce. La figura 3.12 es en la que mejor se refleja este fenómeno, ya que la PCL/UP hasta el momento ha presentado flujos de agua UP constantes con el tiempo. Sin embargo, en la caracterización de transporte de nutrientes de disolución BSA el flujo sufre una acusada caída fruto del efecto de las partículas de BSA en los poros de la membrana.

Tal y como se observó en trabajos anteriores, se prevé que el tipo de fouling de estas membranas sea de tipo interno. Esto es, los poros de la membrana pueden taponarse por acumulación de partículas en el interior de los poros. De esta manera se crearían depósitos que impedirían el paso de la alimentación.

Conociendo los flujos (L/m²h) de disolución de BSA y sabiendo que el ensayo se lleva a cabo a una presión constante de 0.1 bar, se obtiene la permeancia en el estado estacionario de cada uno de los tipos de membrana (L/m²bar). De nuevo son las membranas PCL/UP las que presentan una mayor permeancia de disolución de BSA, (2420 ± 550 (L/m²hbar)) pero es importante destacar que este valor es un orden de magnitud menor al obtenido en las 4 primeras horas de proceso (agua UP y presión constante de 0.16 bar).

Las membranas PCL/Gly y PCL/EtG siguen un comportamiento similar a los conocidos hasta el momento, con valores de permeancia (110 ± 30 y 71 ± 6 (L/m²hbar) respectivamente) significativamente menores a los obtenidos con las PCL/UP, similares entre sí, siendo levemente inferior el valor para las PCL/EtG. Dichos datos de permeancia de disolución de BSA están representados en la figura 3.16.

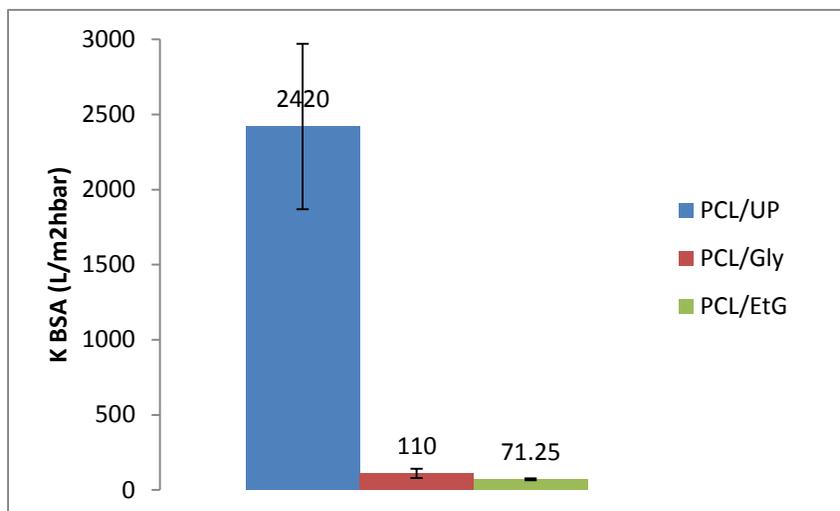


Figura 3.16. Permeancias (L/m²hbar) promedio de disolución de BSA para cada tipo de membrana

Tal y como se detalla en la metodología experimental, a lo largo de las 4 horas en las que se somete a las membranas a la filtración de la disolución de BSA, se toman muestras cada cierto intervalo de tiempo de los flujos de permeado, retenido y tanque de alimentación y se mide su absorbancia a 280 nm. A partir de estos datos se calcula el porcentaje de rechazo de la membrana al paso de BSA a lo largo del tiempo, mostrado en la figura 3.17.

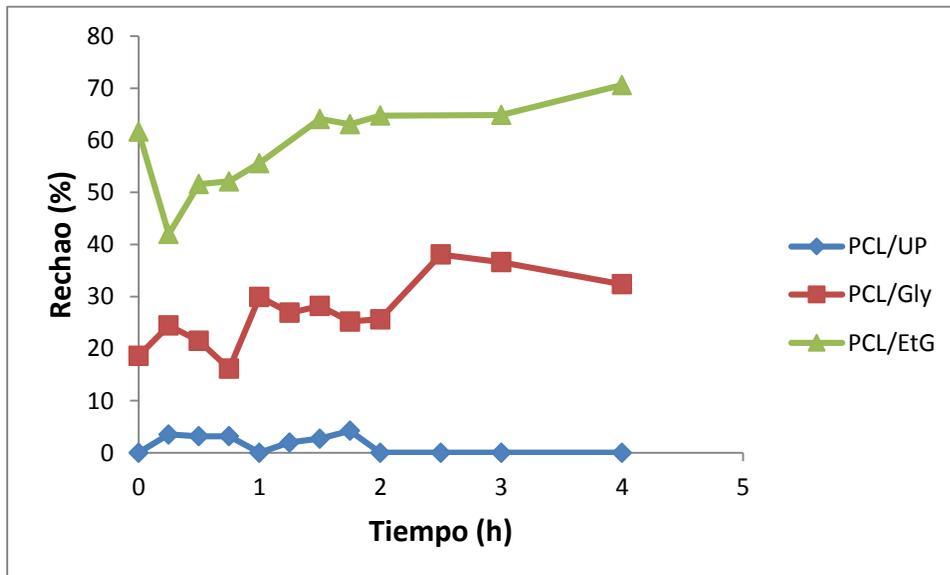


Figura 3.17. Porcentaje de rechazo de BSA a lo largo del tiempo para cada tipo de membrana

Como queda demostrado en la figura 3.17, las membranas PCL/EtG son las que mayor porcentaje de partícula retienen en su superficie, lo que se traduce en un rechazo elevado, concretamente un $70\% \pm 8.1$. Las membranas PCL/Gly rechazan un $25\% \pm 6.1$ de las partículas y por último las PCL/UP rechazan únicamente un $3\% \pm 1.2$. Todo ello guarda

concordancia con los valores de caídas de flujo y permeancias que se han ido obteniendo a lo largo de los experimentos.

Conocer el rechazo que provoca cada membrana es esencial para valorar la viabilidad del uso de preservantes, ya que guarda estrecha relación con la cantidad de transporte de nutriente que proporcione la membrana.

Que se produzca poco rechazo es indicativo de que las membranas tendrán buenas permeabilidades respecto a otros nutrientes, ya que el tamaño de moléculas de BSA son dos órdenes de magnitud superiores al resto de nutrientes.

Respecto a trabajos anteriores [21], los valores obtenidos de permeancia de flujo de agua UP fueron de 268 ± 33 (L/m²hbar), la permeancia del flujo de disolución de BSA 41 ± 11 (L/m²hbar) y por último el rechazo fue de un 17 ± 12 (%).

4. CONCLUSIONES

Este proyecto ha servido para conocer la influencia de los agentes preservantes (glicerina y etilenglicol) en el análisis de caracterización de flujo de agua UP y de transporte de nutrientes de membranas fabricadas a partir de poli- ϵ -caprolactona mediante la técnica inversión de fases, utilizando isopropanol como baño de coagulación. Respecto a trabajos anteriores [20,21], se trata de membranas porosas con morfología adecuada para permitir el crecimiento celular.

Como conclusión a este trabajo fin de grado, se puede confirmar sin lugar a dudas el efecto negativo de dichos preservantes en las membranas PCL. Las caracterizaciones de flujo de agua UP nos han aportado datos de permeancias de las PCL/UP respecto a las PCL/Gly y PCL/EtG de uno o dos órdenes de magnitud superior (16400 ± 3540 , 1061 ± 475 , 637 ± 146 respectivamente)

Debido a la falta de información previa, se llevó a cabo otro proceso de limpieza de las membranas más exigente al que se había considerado previamente (agua UP), utilizando en este caso etanol. Con este cambio se pretendía comprobar si las bajas permeancias de las PCL/Gly y PCL/EtG se debían a un lavado previo insuficiente y por lo tanto, a que las membranas fueran sometidas al sistema de flujo tangencial sin haber eliminado del todo el preservante.

Los datos resultaron que aun utilizando dicho método de limpieza, más afín a los preservantes empleados, y con posibilidad de degradación de la membrana [22], lo cual aumentaría el flujo a través de éstas, las permeancias se mantenían en los valores anteriores, inferiores a lo esperado (PCL/Gly= 743 y PCL/EtG=550). Por lo tanto los protocolos de limpieza no afectan a los flujos. De no ser así se apreciaría un considerable aumento de flujo.

Por otro lado la caracterización de flujo de disolución de BSA nos ha proporcionado información acerca del transporte de nutrientes a través de la membrana. Dichas membranas sufren un taponamiento progresivo de los poros al hacer pasar a través de ellas la disolución de BSA. Es por ello por lo que los flujos de los 3 tipos de membrana sufren un proceso de *fouling* y las permeancias para cada tipo de membrana son muy inferiores a los resultados fruto de la caracterización de flujo de agua UP.

El rechazo que provoca cada PCL una vez más confirma que el uso de preservantes en las membranas, previo a su implantación, provoca elevados porcentajes de rechazo frente a las membranas sin baño de preservación. Dichos valores se traducen en membranas que no proporcionarían el transporte de nutrientes necesarios para la regeneración celular, lo cual provocaría la muerte celular. Concretamente las PCL/Gly ($25 \% \pm 6.1$) y las PCL/EtG ($70\% \pm 8.1$) tienen significativas diferencias respecto al rechazo de la PCL/UP ($3 \% \pm 1.2$). Valores en torno al 10-20% de rechazo supondrían buenas propiedades de transporte de nutrientes.

Por otro lado el rechazo de BSA en la membrana no siempre supone un efecto negativo. Está comprobado que la adhesión de las células a la membrana es un efecto positivo pero prevalecen los valores altos de permeancia frente a los de adhesión de células [26].

Se seguirán llevando a cabo diferentes experimentos de caracterización de flujo de agua UP y transporte de nutrientes para contrastar y corroborar, por un lado, las hipótesis de la elección de membranas no representativas, como el caso de la glicerina en la caracterización de agua UP y por otro del efecto del ensuciamiento o taponamientos de los poros de la membrana y su correspondiente efecto *fouling* sobre el flujo.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Diban N. Stamatialis D. "Polymeric hollow fiber membranes for bioartificial organs and tissue engineering applications" 2014. Society of Chemical Industry. Wiley Online Library.
- [2] "Scaffolds implants for the bone regeneration. Materials, techniques and modeling" (Consulta 18 Febrero 2016) http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol_29_1_10/ibi08110.htm
- [3] Diban N. Stamatialis D. "Polymeric hollow fiber membranes for bioartificial organs and tissue engineering applications" 2014, 2. Society of Chemical Industry. Wiley Online Library.
- [4] Cultek. "Soluciones cultivos celulares. Protocolos y técnicas" http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-cultivos_celulares-protocolos.pdf
- [5] "Poly (ϵ -caprolactone) Films with Favourable Properties for Neural Cell Growth Poly(ϵ -caprolactone) Films with Favourable Properties for Neural Cell Growth" Department of Chemical and Biomolecular Engineering, ETSIIyT, University of Cantabria, España. 2014, 1.
- [6] R. Pörtner, S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz, and N. M. Meenen, "Bioreactor design for tissue engineering," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 100, no. 3, pp. 235–245, 2005.
- [7] Nasin Salehi-Nik et al. "Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering", Tehan, Irán, Hindawi, BioMed Research International, 2013, 1.
- [8] R. Pörtner and C. Giese, "An overview on bioreactor design, prototyping and process control for reproducible threedimensional tissue culture," in *Culture of Cells For Tissue Engineering*, G. Vunjack-Novakovic and R. Ian Freshney, Eds., pp. 53–78, JohnWiley & Sons, 2006.
- [9] I. Martin, D. Wendt, and M. Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering," *Trends in Biotechnology*, vol. 22, no. 2, pp. 80–86, 2004.
- [10] Y. Martin and P. Vermette, "Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances," *Biomaterials*, vol. 26, no. 35, pp. 7481–7503, 2005.
- [11] Nasin Salehi-Nik et al. "Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering", Tehan, Irán, Hindawi, BioMed Research International, 2013, 11.

- [12] M. Ellis, M. Jarman-Smith, and J. B. Chaudhuri, "Bioreactor systems for tissue engineering: a four-dimensional challenge," in *Bioreactors For Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*, M. Al-Rubeai and J. B. Chaudhuri, Eds., pp. 1–18, Springer, 2005.
- [13] R. Eibl, D. Eibl, R. Portner, G. Catapano, and P. Czermak, *Cell and Tissue Reaction Engineering*, Springer, New York, NY, USA, 2008.
- [14] S. D. Waldman, D. C. Couto, M. D. Grynpas, R. M. Pilliar, and R. A. Kandel, "Multi-axial mechanical stimulation of tissue engineered cartilage: review," *European Cells and Materials*, vol. 13, pp. 66–73, 2007.
- [15] N. Tandon, A. Marsano, R. Maidhof et al., "Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation," *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 6, pp. 692–700, 2010.
- [16] J. Malda, M. Radisic, S. Levenberg et al., "Cell nutrition," in *Tissue Engineering*, C. van Blitterswijk, P. Thomsen, J. Hubbell et al., Eds., pp. 328–362, 2008.
- [17] Nasin Salehi-Nik et al. "Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering", Tehan, Irán, Hindawi, BioMed Research International, 2013, 4.
- [18] E. Oragui, M. Nannaparaju, and W. S. Khan, "The role of bioreactors in tissue engineering for musculoskeletal applications," *The Open Orthopaedics Journal*, vol. 5, pp. 267–270, 2011.
- [19] P. Rolfe, "Sensing in tissue bioreactors," *Measurement Science and Technology*, vol. 17, no. 3, pp. 578–583, 2006.
- [20] Bengoechea 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] Gómez Ruiz, B. 2014. Caracterización de las propiedades de transporte de membranas biodegradables de poli-ε-caprolactona en ingeniería tisular. DIBAN, N. (dir.). Proyecto Fin de Carrera, Universidad de Cantabria.

[22] Holly Shearer, M. Eng., Marianne J. Ellis. *Effects of common sterilization methods on the structure and properties of poly scaffolds*. Tissue Engineering, volume 12, number 10, 2006.

[23] N. Diban, D. Stamatialis, Macromol. Symp. 2011, 309/310, 93.

[24] N. Diban. Dimitrios Stamatialis. *Effect of Surface Morphology of Poly(e-caprolactone) Scaffolds on Adipose Stem Cell Adhesion and Proliferation*. Macromol. Symp. 2013, 334, 126–132.

[25] Marcel Mulder, *Basic Principles of membrane Technology*, 2011.

[26] Buddy D. Ratner. *Biomaterial science. An introduction to material in medicine*. 3rd Edition, 2013.

[27] KELLY, ST; ZYDNEY, AL. 1995. *Mechanisms for BSA fouling during microfiltration*. Journal of Membrane Science, 107 (1-2), pp. 115-127.