



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

**DESARROLLO DE MEMBRANAS
POLIMÉRICAS MICROPOROSAS
TRANSLÚCIDAS COMO SOPORTE
CELULAR PARA UN DISPOSITIVO DE
COCULTIVO MICROFLUÍDICO**

AUTORA: ALICIA NADERPOUR PEÑALVER

TUTOR: GUILLERMO VILARIÑO FELTRER

COTUTOR: JOSÉ ANTONIO GÓMEZ TEJEDOR

Curso Académico: 2016-17

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis tutores, el Dr. Guillermo Vilariño y el Dr. José Antonio Gómez, la oportunidad de realizar este Trabajo Fin de Grado. Como también quisiera agradecerse a la Dra. Ana Vallés. Agradecer además, al Dr. Guillermo Vilariño el esfuerzo y tiempo dedicado.

Agradecer también a mi gran compañera de vida universitaria, por las experiencias que hemos compartido, por los buenos ratos que hemos pasado riéndonos hasta hacer saltar las lentillas y por los no tan buenos, porque siempre has estado ahí para animarme.

A ti, Luis, por el apoyo que me brindas en todo momento. Por tu comprensión y confianza, por hacerme sentir como si fuera una niña otra vez, en definitiva, porque haces que todo parezca más fácil.

A mi familia por su amor incondicional, pero sobre todo a mi madre por el ejemplo de lucha y superación que ha supuesto y supone para mis hermanos y para mí.

A todos ellos, gracias, por haberme apoyado para conseguir mis propósitos.

RESUMEN

Título

Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo microfluídico.

Resumen

Una de las enfermedades más comunes en personas mayores de 60 años son las renales. Por ello, actualmente se pretende desarrollar nuevos fármacos, así como estudiar el comportamiento de los diferentes tipos celulares que intervienen en el tejido renal y sus patologías. En esta línea, este trabajo se plantea la posibilidad de desarrollar una membrana microporosa translúcida que servirá de membrana de separación entre los cultivos de diferentes linajes celulares en un dispositivo microfluídico para simular tejido renal *in vitro*.

Se propone la fabricación de una membrana polimérica con unas determinadas características que la hagan útil para acoplarse a un sistema estratificado membrana-andamiaje poroso-membrana que simule la disposición estructural de los tejidos que componen los túbulos renales. La fabricación de las membranas se basa en la técnica de congelación y precipitación por inmersión. Por ello, se ha seleccionado un bipolímero que tiene una serie de especificaciones que lo hacen deseable, y se ha estudiado el equilibrio multicomponente del polímero, un disolvente afín para preparar las disoluciones poliméricas de las que se partirán para la fabricación de las membranas, y un no-solvente necesario para la precipitación y obtención de las membranas.

Además, se ha estudiado el efecto de parámetros tales como la velocidad de congelación de la disolución polimérica, la temperatura del no-solvente, la disolución polimérica de partida, o la concentración de polímero sobre las propiedades finales de las membranas poliméricas. Mediante un diseño de experimentos ortogonal se ha realizado un cribado de los diferentes parámetros para maximizar las propiedades óptimas de la membrana, a saber, que sea un material biocompatible, que tenga una porosidad homogéneamente distribuida, que no hinche en agua, que no se degrade a temperaturas altas (pues la membrana se va a sellar térmicamente al andamiaje y el dispositivo microfluídico), y que sea translúcida en la medida de lo posible para analizar y trazar las células a un lado y a otro de la membrana con un microscopio óptico.

Por último, se caracterizarán las membranas obtenidas con la selección de parámetros óptimos mediante microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial, ensayos de hinchado en medio acuoso y ensayos de permeabilidad.

Palabras clave

Membrana polimérica, inversión de fase, policaprolactona, diseño de experimentos, ingeniería tisular, simulación de tejido renal.

RESUM

Títol

Desenvolupament de membranes polimèriques microporoses translúcides com a suport cel·lular per a un dispositiu de cocultiu microfluídic.

Resum

Una de les malalties més comuns en persones majors de 60 anys són les renals. Per això, actualment es pretén desenvolupar nous fàrmacs, així com estudiar el comportament dels diferents tipus cel·lulars que intervenen en el teixit renal i les seues patologies. En aquesta línia, aquest treball es planteja la possibilitat de desenvolupar una membrana microporosa translúcida que servirà de membrana de separació entre els cultius de diferents llinatges cel·lulars en un dispositiu microfluídic per a simular teixit renal *in vitro*.

Es proposa la fabricació d'una membrana polimèrica amb unes determinades característiques que la facen útil per acoblar-se a un sistema estratificat membrana-bastida porosa-membrana que simule la disposició estructural dels teixits que componen els túbuls renals. La fabricació de les membranes es basa en la tècnica de congelació i precipitació per immersió. Per això, s'ha seleccionat un biopolímer que té una sèrie d'especificacions que ho fan desitjable, i s'ha estudiat l'equilibri multicomponent del polímer, un dissolvent afí per preparar les dissolucions polimèriques de les quals es partiran per a la fabricació de les membranes, i un no-solvent necessari per a la precipitació i obtenció de les membranes.

A més, s'ha estudiat l'efecte de paràmetres com la velocitat de congelació de la dissolució polimèrica, la temperatura del no-solvent, la dissolució polimèrica de partida, o la concentració de polímer sobre les propietats finals de les membranes polimèriques. Mitjançant un disseny d'experiments ortogonal s'ha realitzat un garbellat dels diferents paràmetres per maximitzar les propietats òptimes de la membrana, a saber, que siga un material biocompatible, que tinga una porositat homogèniament distribuïda, que no unfle en aigua, que no es degrade a temperatures altes (per quan que la membrana es va a segellar tèrmicament a la bastida i el dispositiu microfluídic), i que sigui translúcida en la mesura del que siga possible, per analitzar i traçar les cèl·lules a un costat i a un altre de la membrana amb un microscopi òptic.

Finalment, es caracteritzaran les membranes obtingudes amb la selecció de paràmetres òptims mitjançant microscopia electrònica de rastreig, calorimetria diferencial, assajos d'unflat en medi aquós i assajos de permeabilitat.

Paraules clau

Membrana polimèrica, inversió de fase, policaprolactona, disseny d'experiments, enginyeria tissular, simulació de teixit renal.

ABSTRACT

Title

Development of translucent microporous polymer membranes as cellular supports for a microfluidic coculture device.

Abstract

One of the most common diseases in people older than 60 years are those related to the kidney. Therefore, currently therapies intends to develop new drugs, as well as to study the behavior of different cell types involved in renal tissue and its pathologies. In this way, this work raises the possibility of developing a translucent microporous membrane that will serve as a separation membrane between cultures of different cell lineages in a microfluidic device to simulate kidney tissue *in vitro*.

Here the manufacture of a polymeric membrane with certain characteristics is proposed. Such properties make it suitable to be attached to a stratified membrane/scaffold porous-membrane system that simulate the structural arrangement of renal tubule tissue. The manufacture of membranes is based on freeze-extraction and precipitation by immersion technique. Therefore, it has been selected a biopolymer that has a series of specifications that make it desirable. The multi-component equilibrium of the polymer, a solvent, to prepare polymer solutions that they will depart for the manufacture of membranes, and a non-solvent, needed for precipitation and obtaining of the membranes, has been studied either.

In addition, the effect of some parameters over the final membrane properties has been studied, such as the speed of freezing the polymer solution, the temperature of the non-solvent bath, the polymer-solvent mixture, or the concentration of polymer. The optimal combination of parameters that maximize the properties of the membrane was assessed through an orthogonal design of experiments. Such optimal conditions must fulfill that the membrane is produced from a biocompatible material, that has an evenly distributed porosity, which does not swell in water, which does not degrade at high temperatures (because the membrane is intended to be sealed thermally to the scaffold and the microfluidic device), and that is as translucent as possible, in order to analyze and trace the cells on one side and another with optical microscopy.

Finally, the membranes obtained after the screening of optimal parameters will be characterized by scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, swelling assays and permeability tests.

Key words

Polymer membrane, phase inversion, poly(caprolactone), design of experiments, tissue engineering, renal tissue simulation.

DOCUMENTOS CONTENIDOS

- Memoria
- Presupuesto

MEMORIA

ÍNDICE DE LA MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Tejido renal	1
1.1.2. Simulación de tejido renal	4
1.1.2.1. Microfluídica	4
1.1.2.2. Fenómenos de dispersión de la luz	6
1.1.3. Membranas	7
1.1.4. Biomateriales poliméricos	9
1.1.4.1. Biomateriales poliméricos para ingeniería tisular renal	10
1.2. Motivación	11
1.3. Justificación	12
2. OBJETIVOS	13
3. NORMATIVA	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Sustancias	15
4.2. Material de laboratorio	15
4.3. Equipos	16
4.4. Método experimental	17
4.4.1. Estudio del equilibrio PCL/acetona/agua	17
4.4.2. Experimentos previos	17
4.4.3. Diseño de experimentos	21
4.4.4. Ensayos de caracterización de las membranas del diseño de experimentos	23
4.4.4.1. Ensayo de microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM)	23
4.4.4.2. Ensayo de porosidad	24
4.4.4.3. Ensayo de manipulabilidad	27
4.4.5. Ensayos de caracterización de las membranas óptimas	28
4.4.5.1. Ensayo de espectrofotometría visible	28
4.4.5.2. Ensayo de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	29
4.4.5.3. Ensayo de permeabilidad	29

4.4.5.4. Ensayo de termogravimetría (TGA).....	31
4.4.5.5. Ensayo de hinchado en medio salino.....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. Estudio del equilibrio PCL/acetona/agua.....	33
5.2. Caracterización preliminar de las técnicas de inversión de fase y sus modificaciones.....	34
5.3. Caracterización de las membranas para el diseño de experimentos	36
5.3.1. Caracterización morfológica.....	36
5.3.2. Resultados del ensayo de porosidad.....	38
5.3.3. Resultados del ensayo de manipulabilidad.....	38
5.4. Resultados del diseño de experimentos en cuadrados latinos.....	40
5.5. Ensayos de caracterización de las membranas óptimas	43
5.5.1. Ensayo de espectrofotometría.....	44
5.5.2. Resultados del ensayo de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	45
5.5.3. Resultados del ensayo de termogravimetría (TGA).....	47
5.5.4. Resultados del ensayo de permeabilidad.....	48
5.5.5. Resultados del ensayo de hinchado en medio salino.....	50
6. CONCLUSIONES	51
7. PERSPECTIVAS DE FUTURO	53
8. BIBLIOGRAFÍA.....	55

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Actualmente, uno de los grupos de enfermedades más comunes en personas mayores de 60 años de edad son las renales, lo cual se debe a que éstas vienen desencadenadas por otras enfermedades como la diabetes mellitus, la hipertensión y enfermedades vasculares, principalmente (Registro Español de Enfermedades Renales, 2014).

Técnicas como el tratamiento con diálisis o el trasplante de órganos son utilizadas a día de hoy para tratar a pacientes con insuficiencia renal, aunque el trasplante de riñón se suele escoger como última opción por la escasez de donantes. El tratamiento con diálisis, ya sea hemodiálisis o diálisis peritoneal, es la técnica más parecida al funcionamiento de un riñón que se utiliza actualmente, cuyo funcionamiento consiste en filtrar la sangre del paciente mediante un filtro biológico. Sin embargo, la diálisis no realiza un filtrado tan bueno como los propios riñones pudiendo provocar uremia, es decir, una acumulación de urea en la sangre, que debido al deficiente proceso de filtrado no ha podido ser eliminado por la orina (Colbert, Ankney & Lee, 2009).

Por otro lado, enfermedades renales agudas como la formación de piedras en el riñón pueden ser tratadas con medicación, o bien utilizar los fármacos como prevención para la formación de éstas. Otra de las enfermedades renales que requiere de tratamiento con medicación es la nefropatía en estadio temprano, la cual provoca una obstrucción de los vasos sanguíneos del riñón (Colbert, Ankney & Lee, 2009).

Los fármacos usados como terapia en estas patologías deben ser sometidos a ensayos clínicos en pacientes antes de sacarlos al mercado. En las primeras fases de los ensayos donde normalmente va a ser necesario realizar cambios en la composición del fármaco, se requiere grandes tiempos y amplias baterías de ensayos para poder completar estas fases iniciales. En fases más avanzadas donde se realizan los ensayos con humanos, la variabilidad de éstos es uno de los inconvenientes, además de que conlleva problemas éticos y económicos (Giménez *et al.*, 2016).

Por ello, estudiar el comportamiento del riñón *in vitro* con mucho detalle es muy importante para mejorar los tratamientos para diferentes enfermedades renales.

1.1.1. Tejido renal

Los riñones son órganos con un tejido cuya función principal es la de filtrar la sangre que circula por el torrente sanguíneo, ayudando a controlar la presión, eliminando los desechos como toxinas, compuestos nitrogenados y fitosanitarios, así como los iones en exceso. Además, regula la composición química de la sangre filtrada para que exista un balance electrolítico y un equilibrio entre los ácidos y las bases (Marieb, 2008).

En cuanto a la estructura morfológica del riñón, se puede decir que está dividido en tres capas, de exterior a interior: la corteza renal, la médula renal y la pelvis renal (Ilustración 1).

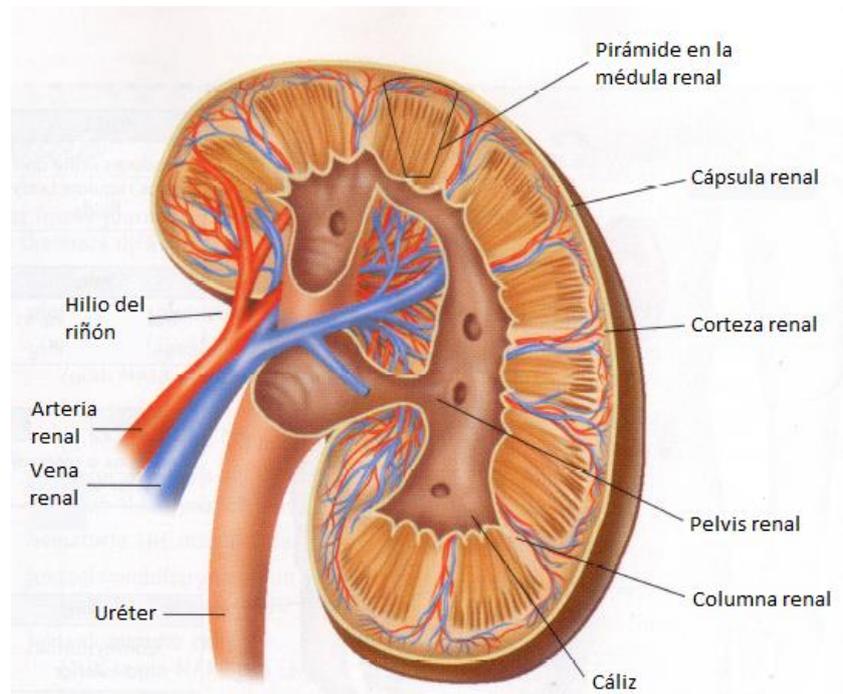


Ilustración 1. Anatomía interna y externa del riñón. Adaptada de (Colbert, Ankney & Lee., 2009)

En la corteza renal es donde se realiza el filtrado de la sangre. La médula renal contiene varias áreas con forma de triángulo estriado denominadas pirámides renales o de Malpighi. Dichas pirámides están compuestas por una colección de túbulos, separadas por unas estrechas columnas renales que son extensiones de la corteza renal.

La pelvis renal es un embudo dividido en dos o tres tubos llamados cálices mayores, divididos a su vez en varios cálices menores cuya función es coleccionar la orina que se forma en el riñón (Colbert, Ankney & Lee, 2009).

El proceso de filtrado que se produce en el tejido renal viene definido por su estructura anatómica a nivel microscópico, la cual se explica mediante el funcionamiento de la nefrona, su unidad funcional.

La nefrona se divide en dos partes, el túbulo renal y el corpúsculo renal, que es el que actúa de filtro (Ilustración 2). A su vez éste se divide en el glomérulo y una membrana de doble capa llamada cápsula de Bowman (Ilustración 3) (Colbert, Ankney & Lee, 2009).

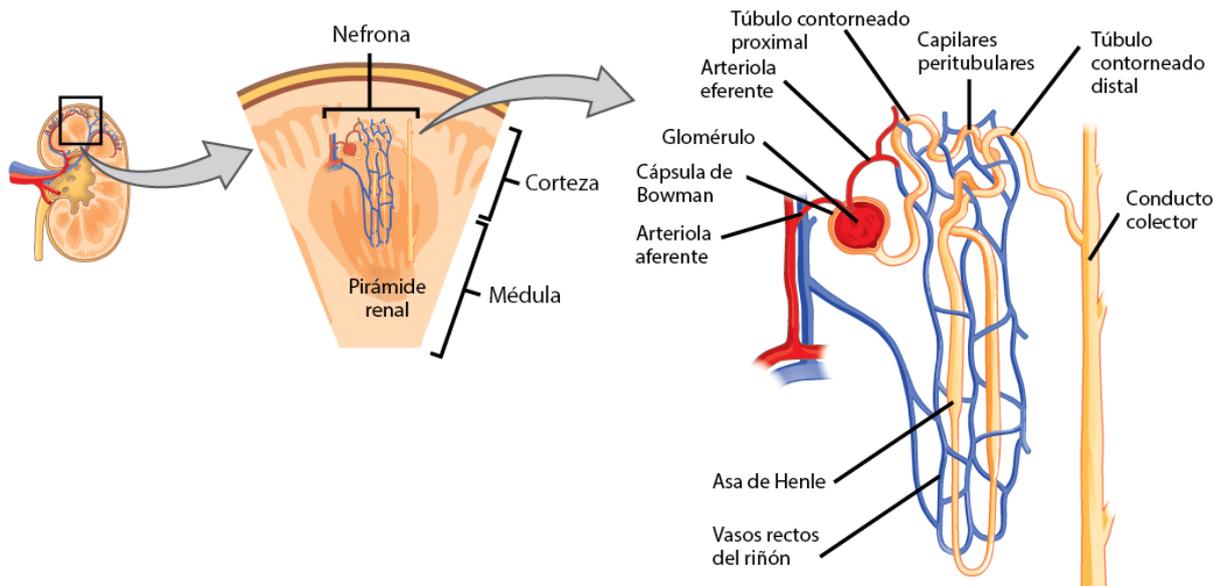


Ilustración 2. Ubicación, estructura y elementos tisulares de la nefrona (Padial, J., 2016)

A nivel histológico, dicha cápsula está formada por podocitos muy ramificados y entrelazados rodeando al glomérulo, de forma que los defectos de la membrana basal glomerular generan unas aperturas, los conocidos *poros de filtración molecular*, que producen la formación de una membrana porosa alrededor del glomérulo, permitiendo así filtrar la sangre (Marieb, 2008).

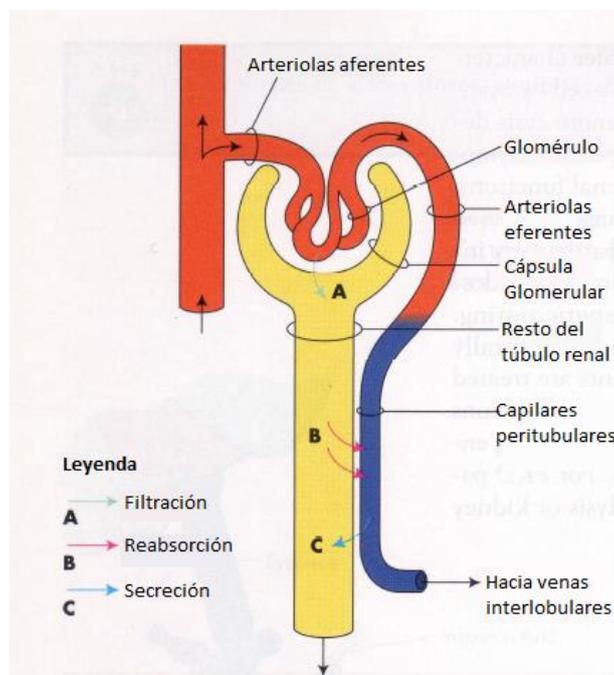


Ilustración 3. Ampliación del corpúsculo renal. Adaptada de (Colbert, Ankney & Lee, 2009)

El proceso de filtrado se produce por la diferencia de presión osmótica. Los podocitos y las paredes capilares del corpúsculo renal crean un filtro con aperturas fijas. El plasma sanguíneo y muchas otras sustancias disueltas en el plasma pasan a través del filtro. Sin embargo, los glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y algunas moléculas grandes como proteínas no pasan a través del filtro en un riñón sano. Lo que pasa a través del filtro está predeterminado por el tamaño de las aperturas mencionadas anteriormente (Colbert, Ankney & Lee, 2009).

Sin embargo, cuando alguna de estas partes del órgano sufre alguna alteración con respecto a su funcionamiento basal, se provocan disfunciones o enfermedades renales, como por ejemplo la insuficiencia renal, que es una enfermedad progresiva en la que se produce una disminución del filtrado de forma que los desechos tóxicos se acumulan en la sangre debido a que las células tubulares del riñón dejan de realizar su función (Marieb, 2008).

Con tal de paliar los daños renales y acelerar la reparación del daño agudo de riñón, se está estudiando en el campo de la medicina regenerativa, cuya disciplina se centra en la reparación de órganos, tejidos o células dañadas mediante el implante de células o de tejidos u órganos bioartificiales. En la actualidad se busca, mediante diferentes estrategias, reducir los niveles de urea y creatinina (Cho *et al.*, 2017), inhibir los procesos inflamatorios o promover la regeneración de tejido funcional (Thakkar, Vanikar, & Trivedi, 2017).

1.1.2. Simulación de tejido renal

La simulación de tejido renal tiene una gran variedad de aplicaciones. Ejemplos de éstas son la expansión de células en un biorreactor para terapia celular puesto que el riñón tiene una gran capacidad para regenerarse después de haber sufrido un daño, utilizando para ello células madre de médula ósea o de músculo esquelético principalmente (Lin, 2010) y la formación de nuevos andamiajes celularizados para ingeniería tisular que presenten unas propiedades estructurales, mecánicas y fisiológicas adecuadas. Además, es útil para experimentos que permitan desarrollar modelos fisiológicos matemáticos (Layton, 2013), para generar *phantoms* de imagen médica (Hunt *et al.*, 2013) o para análisis del efecto de fármacos (Wilmer *et al.*, 2016).

1.1.2.1. Microfluídica

La microfluídica se centra en el estudio de los fenómenos de transporte de los microfluidos, que son fluidos considerados en la microescala, así como del diseño de dispositivos microfluídicos para el estudio de sistemas celulares. El campo de la microfluídica utiliza microestructuras de entre 10 y 100 micrometros (conductos, dispensadores, colectores...), los cuales permiten manipular volúmenes del orden de nanolitros o menos de fluido. Estos dispositivos, denominados *lab-on-a-chip* originalmente, se usaban para química analítica; sin embargo, la microfluídica se ha ido expandiendo a muchas áreas, particularmente al campo de la química y biología para mejorar diagnósticos clínicos (Tarn & Pamme, 2014).

Las principales ventajas por las que se suele escoger este campo de estudio frente a otros más convencionales es la rapidez en la toma de muestras y el control preciso de los fluidos en un ensayo.

En los dispositivos microfluídicos el flujo casi siempre suele ser laminar, de forma que la dinámica de fluidos es bastante predecible. El transporte molecular cambia drásticamente ya que la mezcla por convección no ocurre, permitiendo así predecir la cinética de difusión.

La tensión superficial describe la tendencia de un fluido en una superficie a reducir su energía libre en la interfase superficie-aire. La tensión interfacial explica un fenómeno parecido, pero aplicado a dos fluidos inmiscibles. Estas fuerzas toman un papel más importante a microescala comparado con la gravedad, la cual es más dominante a macroescala (milímetros y más). Estos fenómenos se utilizan en los *lab-on-a-chip*, para realizar una clasificación de proteínas y células, desarrollar nanoreacciones, para la cristalización de proteínas, transportar los fluidos a través de los microcanales (Chen, Feng, Du, & Liu, 2008) e incluso separar por tamaños, morfología o afinidad diferentes tipos celulares (Baret *et al.*, 2009).

Un efecto particular de la microfluídica es el movimiento del fluido a través de un material poroso permitiendo que el fluido avance en oposición a la gravedad debido a que la fuerza más dominante respecto a las anteriores es la acción capilar.

Por las ventajas que ofrece las características de los dispositivos microfluídicos, la industria farmacéutica persigue un cambio en la forma en la que se están desarrollando y aprobando actualmente los nuevos fármacos con tal de disminuir el coste de éstos. Un dispositivo microfluídico puede reproducir la función de un órgano *in vivo* en un microchip, un aparato que integra componentes microfluídicos constituido por un biopolímero, denominado *organ-on-a-chip*. Dicho dispositivo integra varios componentes microfluídicos en un único aparato *in vitro*, permitiendo sintetizar cuidadosamente la función *in vivo* (tanto del órgano sano como del órgano dañado, Ilustración 4) (Sackmann, Fulton, & Beebe, 2014).

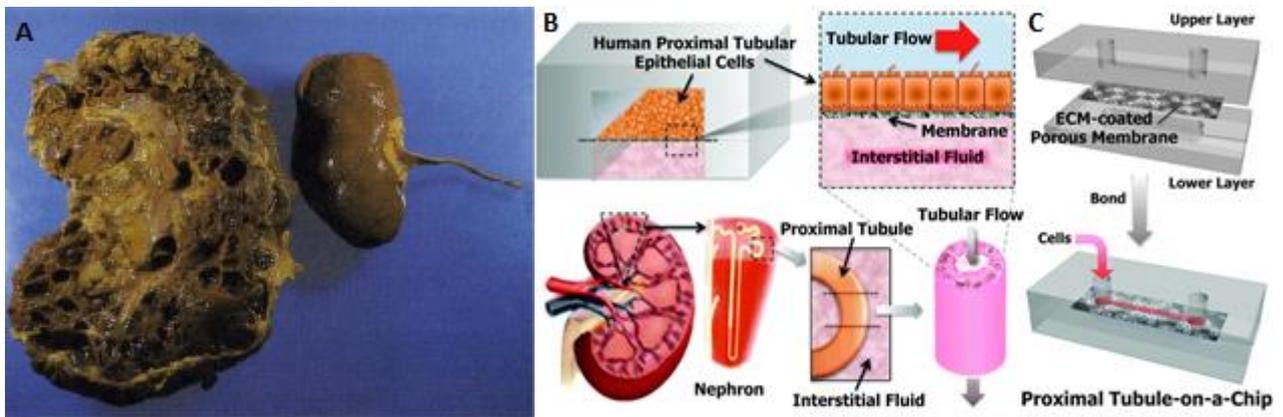


Ilustración 4. (A) Comparación de riñón sano (derecha) y dañado (izquierda) (Colbert, Ankney & Lee, 2009). (B) Esquema de un dispositivo microfluídico en comparación con el túbulo renal. (C) Kidney-on-a-chip (Jang *et al.*, 2013)

Generalmente, los dispositivos microfluídicos que trabajan con células se suelen fabricar a partir de materiales traslúcidos o transparentes (p.ej. PDMS o polímero SU-8), para poder analizar y trazar con microscopía óptica las células durante su tránsito por el *lab-on-a-chip* (inspección visual del interior de

las cámaras y los conductos) o integradas en el *organ-on-a-chip*. Por tanto, son dispositivos que requieren ser transparentes, entre otras características (Urríos *et al.*, 2016).

1.1.2.2. Fenómenos de dispersión de la luz

La refracción de la luz se produce cuando el ángulo de incidencia de la luz varía al cambiar a un medio con un índice de refracción distinto. Dicho índice representa la relación de la velocidad de la luz en el vacío (c) con la velocidad del fotón en un determinado medio (u), de acuerdo a la ecuación 1 (Drosdoff & Widom, 2005).

$$n = \frac{c}{u} \quad (1)$$

A partir de la ley de Snell, ecuación 2, se puede relacionar el ángulo de incidencia de la luz en dos medios diferentes (Drosdoff & Widom, 2005).

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (2)$$

La dispersión de la luz en un medio heterogéneo con diferentes índices de difracción se puede explicar mediante la dispersión de Mie y la dispersión de Rayleigh.

La dispersión de la luz en un medio depende del tamaño de partículas presentes en dicho medio, por un lado, la dispersión debida a aquellas que tienen el mismo tamaño o mayor que la longitud de onda de la luz visible, que viene descrita por la dispersión de Mie y, por otro lado, la dispersión debida a partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz, la cual viene definida por la dispersión de Rayleigh (Ilustración 5). Rayleigh afirmaba que la proporción de luz dispersa es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda, por tanto, las partículas de menor tamaño que la longitud de onda de la luz dispersará en mayor proporción la luz de longitud de onda menor (Drake & Gordon, 1985).

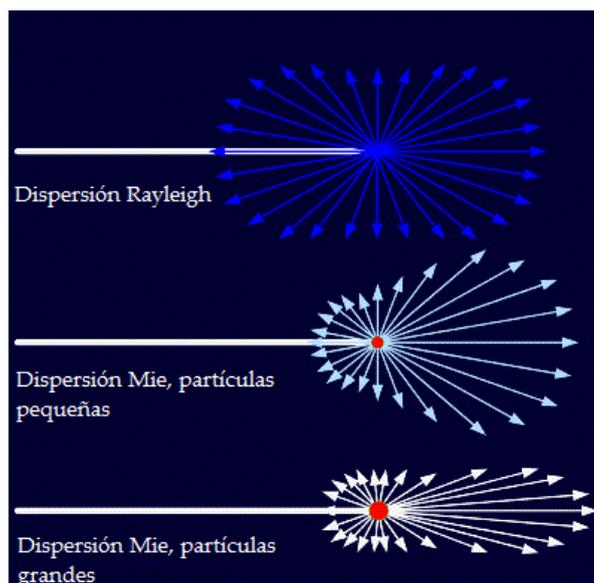


Ilustración 5. Comparación de la dispersión de Rayleigh y de Mie

En la dispersión de Mie, el tamaño, forma y el índice de difracción de la partícula dispersa influyen en la longitud de onda de la luz dispersa (Saidi, Jacques, & Tittel, 1995).

Las propiedades de una estructura porosa (como la distribución y el tamaño de poro) influyen en la dispersión de la luz. Por ello, el tamaño de poro debería ser menor que la longitud de onda de la luz visible (que es sobre 380 – 700nm), preferiblemente inferior a 80nm, para lograr una estructura con propiedades ópticas (transparencia) difusas. Por otro lado, la forma exacta del poro individual no es tan importante para la dispersión de la luz como lo es la porosidad media o la distribución de poros, que dan más información sobre las propiedades ópticas resultantes (Penttilä & Lumme, 2009). Estos tamaños de poro descritos, sin embargo, se encuentran en el rango de las membranas de ultrafiltración, donde la resistencia que estas ofrecen al paso de moléculas grandes disueltas como proteínas es considerable y, en algunos casos, pueden actuar incluso como barrera química (Charcosset, 2012).

1.1.3. Membranas

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de la tecnología de membranas para diferentes aplicaciones como la desalación de agua por ósmosis inversa, la eliminación de sustancias orgánicas mediante nanofiltración o la eliminación de contaminantes por electrodiálisis reversible cuya fuerza impulsora es el potencial eléctrico en vez de la presión hidrostática como en los casos anteriores (American Membrane Technology Association (AMTA), 2007).

Otra de las aplicaciones que se les ha dado a las membranas porosas ha sido en el campo de la ingeniería tisular para la simulación de membranas epiteliales, o bien de membranas del tejido conectivo.

Los materiales con que más frecuentemente se hacen las membranas para la aplicación mencionada anteriormente son polímeros, por las propiedades tan versátiles que éstos presentan. La síntesis de estas membranas se puede realizar mediante diversas técnicas diferentes.

Algunas de las técnicas más utilizadas son el *freeze-drying*, en la que se congela la disolución polimérica (polímero + disolvente) para hacer sublimar la fase de solvente (Claussen, Ustad, Strømme, & Walde, 2007), la técnica de electrohilado (*electrospinning*) que consiste en proyectar la disolución polimérica desde una aguja a un colector inducido por un campo electromagnético (Wang & Ryan, 2011) o la técnica de *freeze-extraction*, en la cual la disolución polimérica se congela para, posteriormente, sumergirla en un baño de no-solvente del polímero a la temperatura de congelación (Soyekwo *et al.*, 2014).

Otro de los métodos para sintetizar membranas es la técnica de inversión de fase, que resulta de un cambio de fase, es decir, una disolución inicialmente estable se lleva a un equilibrio ternario que supone una mezcla inestable de fases. Esta separación de fases de la disolución polimérica se puede inducir poniendo ésta en una atmósfera saturada en un no-solvente del polímero en fase vapor, por evaporación controlada del disolvente al añadir a la disolución polimérica un no-solvente del polímero, por disminución de la temperatura de la disolución polimérica o por inmersión de la disolución en un baño de no-solvente (Wienk *et al.*, 1995). Algunos ejemplos de sistemas polímero/solvente/no-solvente que se suelen emplear en esta técnica se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos típicos de polímero/solvente/no-solvente utilizados en técnicas de inversión de fase

Polímero	Solvente	No-solvente	Cita
PVDF (Polifluoruro de vinilideno)	DMF (Dimetilformamida)	Octanol	(Soh, Kim, & Gryte, 1995)
PVDF (Polifluoruro de vinilideno)	TBC (Citrato de tributilo)	DEHP (Di (2-etilhexil)ftalato)	(Liu, Xu, Chen, & Wei, 2010)
PDLLG (Ácido poli (D,L-láctico-co-glicólico))	Acetona	Metanol	(Stevanovic, Ignjatovic, Jordovic, & Uskokovic, 2007)
PVB (Butiral de polivinilo)	Etanol	Agua	(Yalcinkaya, 2015)
PLLA (Ácido poli (L-láctico))	Agua	Dioxano	(He <i>et al.</i> , 2009)
PVDF (Polifluoruro de vinilideno)	Triacetato de glicerina	Glicerina	(Rajabzadeh, Maruyama, Sotani, & Matsuyama, 2008)
PAN (Poliacrilonitrilo)	DMSO (Dimetilsulfóxido)	Agua	(Zhang, Zhang, & Zhao, 2011)
PAN (Poliacrilonitrilo)	DMSO (Dimetilsulfóxido)	Etanol	(Zhang, Zhang, & Zhao, 2011)

Por último, una técnica combinada entre la *freeze-extraction* y la inversión de fase es la precipitación por inmersión en frío que consiste en congelar la disolución polimérica para después sumergirla en un baño de no-solvente del polímero a temperatura ambiente para que se produzca un intercambio del disolvente. Con esta técnica se observa un aumento de la homogeneidad en la distribución de poros dentro del espesor de las membranas, con respecto a los procesos de inversión de fase. Además, es un proceso más rápido y práctico que la *freeze-extraction*.

Además, tanto el estudio del diagrama ternario (polímero/solvente/no-solvente) como el estudio de la cinética de la variación de la composición durante la formación de la membrana son necesarios para el control de la estructura porosa final de ésta (Matsuyama, Tachibana, Maki, & Teramoto, 2002).

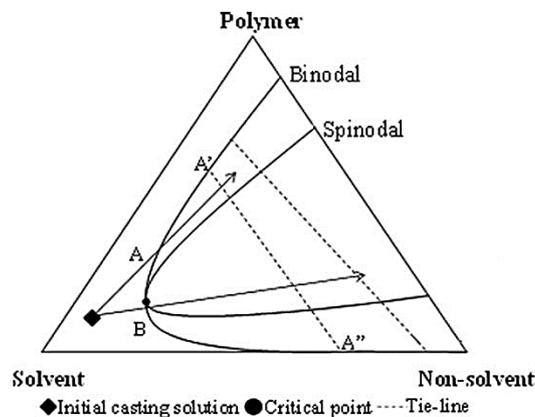


Ilustración 6. Diagrama de fase ternario idealizado. Adaptada de (Vankelecom et al., 2005)

La ilustración 6 muestra un ejemplo de diagrama ternario. En ella, se muestra la separación de fases que se produce en la mezcla tricomponente al variar las concentraciones. La curva binodal determina el límite entre una mezcla donde coexisten los tres componentes en una fase líquida y, una mezcla separada en fases, por un lado el polímero que ha comenzado a precipitar y, por otro lado, una mezcla binaria en fase líquida.

1.1.4. Biomateriales poliméricos

En la década de 1960 surgió un campo nuevo en la investigación que pretendía adoptar los materiales poliméricos para su uso en biología, los actualmente denominados biomateriales poliméricos. Los biomateriales se definieron como “*materiales destinados a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo*” (Leeuwenburgh *et al.*, 2008).

La sustitución de los materiales cerámicos y metálicos comúnmente usados en biomedicina por los relativamente recientes biomateriales poliméricos se debió a las ventajas que presenta este tipo de materiales, pues son fáciles de manejar para la fabricación de componentes con formas complejas y diversas, tienen un coste razonable y una capacidad para adoptar una amplia gama de propiedades físicas y mecánicas (Pielichowska & Blazewicz, 2010).

Existen multitud de biopolímeros que se pueden clasificar como (Ginebra, Gil, & Planell, 2002):

- Poliolefinas. Son polímeros lineales termoplásticos como el polietileno, de alta y de baja densidad, o el polipropileno.
- Poliamidas. Son materiales biodegradables por lo que se utilizan como hilo de sutura.
- Polímeros acrílicos. Tienen aplicación como lentes de contacto así como para fijación de prótesis.
- Termoplásticos de alta resistencia. Tienen buenas propiedades mecánicas, térmicas y químicas
- Poliésteres. Es un polímero termoplástico utilizado en ingeniería tisular para la liberación de fármacos y suturas biodegradables, entre otras.
- Otros: elastómeros, termoestables, etc.

Debido a que los biomateriales poliméricos están destinados a interactuar con sistemas biológicos, como se ha definido anteriormente, éstos deben tener en común características como no toxicidad, biocompatibilidad (que el material no genere rechazo a cuerpo extraño), que sean esterilizables y con una biodegradabilidad determinada de acuerdo a su finalidad.

Además, los biopolímeros se pueden clasificar de la siguiente forma en función de la respuesta del tejido:

- Biotolerantes. Aquellos que, sin generar reacción a cuerpo extraño, nunca se terminan de integrar en el tejido y con el tiempo hay que sustituirlos por la inflamación crónica perenne que presentan.
- Bioinertes. Son materiales no tóxicos pero biológicamente inactivos, es decir, una vez implantado se genera una cápsula fibrosa que reviste al material.

- Bioactivos. Son materiales no tóxicos y biológicamente activos, lo que quiere decir que se forma un enlace interfacial entre el material y el tejido huésped, por tanto, no se genera la cápsula fibrosa.

- Biorreabsorbibles. Materiales no tóxicos que se degradan *in vivo* y sus productos de degradación son metabolizables, como el ácido poli (láctico – co – glicólico) (PLGA) (Bose & Bandyopadhyay, 2013).

Cabe decir que no existe bibliografía sobre el uso de la policaprolactona como polímero para fabricación de membranas por inversión de fase. Sin embargo, es un poliéster alifático que posee unas propiedades que lo hacen útil para esta aplicación. Por ejemplo, que es un material biodegradable, biocompatible y tiene unas buenas propiedades térmicas y mecánicas, puesto que tiene un bajo punto de fusión (alrededor de 60 °C). Además, tiene una baja densidad, facilitando así su procesabilidad (Labet & Thielemans, 2009).

1.1.4.1. Biomateriales poliméricos para ingeniería tisular renal

La investigación sobre biomateriales, que en principio era un campo dentro de la ciencia de materiales y la ingeniería, fue integrando además el campo de la biología y la medicina. A principios de la década de 1990 se introdujo el término de ingeniería tisular, “una disciplina científica dedicada a la generación de nuevos tejidos utilizando los principios de ingeniería en combinación con el conocimiento y aplicación de las ciencias biológicas”. Las células, las moléculas biológicamente activas (señales) y los andamiajes (*scaffolds*) son los tres pilares básicos de la ingeniería tisular, que se combinan para reparar, reemplazar o regenerar las funciones biológicas (Leeuwenburgh *et al.*, 2008).

Por ejemplo, a principios de 1990, Humes desarrolló un dispositivo de asistencia renal que utilizaba membranas de polisulfona, con el inconveniente de que las células epiteliales del túbulo proximal formaban monocapas sobre la superficie de la membrana.

Más adelante, con el descubrimiento del metracrililoiloxietil forforilcolina (MPC), se observó que una mezcla de polímeros al 1% w/w del MPC en polisulfona, a largo plazo, daba lugar a propiedades antitrombogénicas en la superficie de la membrana del lado donde se encuentra la sangre y, propiedades citocompatibles al otro lado (Saito, 2014).

La ingeniería tisular, además de encargarse de reparar, reemplazar y/o regenerar las funciones biológicas, actualmente también se dedica a la simulación de cualquier órgano o tejido, aspecto que ya ha sido desarrollado en el punto 1.1.2.

Uno de los biomateriales más utilizados para la sintetización de un dispositivo microfluídico que simule un riñón (*kidney-on-a-chip*), así como para la fabricación de cualquier *lab-on-a-chip* es el polidimetilsiloxano (PDMS), ya que puede absorber compuestos orgánicos pequeños. Sin embargo, existe un inconveniente a la hora de utilizar el PDMS para esta aplicación debido a que los lípidos (como los fármacos hidrófobos) también se absorben en el PDMS. Con tal de resolver este inconveniente la matriz extracelular artificial de PDMS se recubre en la actualidad con vidrio o poliestireno (Kim & Takayama, 2015).

1.2. Motivación

El presente Trabajo Fin de Grado (TFG), con carácter académico, pretende consolidar y aplicar conocimientos adquiridos a lo largo de los cursos académicos que conforman la titulación de Grado en Ingeniería Química, pues para llevarlo a cabo es necesario tener unos conocimientos previos de:

- Matemáticas, ya que es la herramienta básica para el desarrollo del resto de ciencias y, más concretamente, de la rama de los estudios estadísticos.
- Física, para entender el comportamiento óptico de los materiales desarrollados en este trabajo.
- Química orgánica, permite determinar el comportamiento de los polímeros en relación a los grupos funcionales de los que estén constituidos.
- Termodinámica, con tal de conocer el comportamiento de las disoluciones poliméricas en función de las variables macroscópicas.
- Biopolímeros, ya que permite conocer las características necesarias que debe tener un biopolímero dependiendo de la función biomédica que se le vaya a dar, así como las principales técnicas utilizadas en ingeniería tisular.
- Seguridad en el laboratorio y gestión de residuos.
- Proyectos, para realizar tanto el estudio económico como el presupuesto.

Además pretende que el alumno adquiera autonomía en el desarrollo del método experimental con tal de introducirlo al ámbito laboral.

1.3. Justificación

Actualmente, las primeras fases de los ensayos clínicos para el desarrollo de fármacos destinados a enfermedades renales se realizan con animales. En estas primeras fases, es necesario realizar múltiples pruebas combinando diversos factores, por lo que se requieren grandes tiempos.

Con tal de mejorar el desarrollo de estos fármacos, se pretende sintetizar una membrana con unas determinadas características (transparente, de un determinado tamaño de poro, de alta resistencia mecánica, etc.), para que al disponer dicha membrana encima y bajo un andamiaje, se pueda realizar un cocultivo celular que simule el tejido renal. Para ello, se debe realizar una investigación de los posibles biomateriales poliméricos a utilizar, la técnica mediante la cual se va a fabricar y cómo afecta la variación de unas determinadas condiciones a la estructura final de la membrana.

Este sistema andamiaje-membranas, que simula el tejido renal, se pretende ensamblar en un dispositivo microfluídico para cultivar células de tejido renal y testar fármacos *in vitro*, con tal de poder realizar las primeras fases de los ensayos de dichos fármacos evitando así la prueba en pacientes y disminuyendo el tiempo de ensayo. También se desea estudiar el comportamiento de distintos tipos celulares y patologías relacionadas con estos, con el fin de mejorar los tratamientos actuales de las enfermedades renales.

Este trabajo está enmarcado en el desarrollo del proyecto “Soportes poliméricos multifuncionales para co-cultivo celular indirecto y estimulación química destinados a mimetizar tejido renal *in vitro*” (referencia DPI2015-65401-C3-2-R) del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad, financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este TFG es sintetizar una membrana polimérica con unas propiedades determinadas para su utilización como sustrato de cultivo celular en un dispositivo microfluídico que emule la función del tejido renal (*kidney-on-a-chip*). Dichas propiedades se enumeran a continuación:

- Porosidad pasante de extremo a extremo, que permita el tránsito de fluidos y sustancias disueltas en estos a su través, pero que actúe de barrera para las células, para poder hacer un cocultivo indirecto (sin comunicación ni contacto físico entre dos poblaciones celulares, aunque sí químico).
- Debe absorber muy poca agua en inmersión en medio acuoso, para evitar que la membrana hinche y pueda deformarse o modificar sus propiedades.
- El biopolímero de que se componga la membrana debe ser reconocidamente biocompatible.
- No debe degradarse a la temperatura de sellado (120 °C), ya que se va a sellar una membrana por encima y otra por debajo del andamiaje, y todo el conjunto a una cámara del dispositivo microfluídico.
- En la medida de lo posible, sería interesante obtener una membrana translúcida o transparente, para poder analizar y trazar con un microscopio las células integradas en el *kidney-on-a-chip*.

Para que la membrana posea las propiedades necesarias para dicha aplicación se debe investigar sobre la técnica a utilizar para su síntesis, ya que de ella dependerá la forma de los poros generados, así como de la disolución polimérica de partida, pues en función de sus propiedades se alcanzarán los requisitos de la membrana. Las técnicas de caracterización que se utilizarán para evaluar si la membrana posee los requisitos necesarios para la aplicación que se le va a dar son microscopía electrónica de barrido, como herramienta semicuantitativa de análisis, calorimetría diferencial de barrido, para identificar transiciones térmicas de las membranas, ensayo de hinchado en medio acuoso, para determinar la cinética de hinchado y el contenido en agua de equilibrio, ensayo de permeabilidad al tránsito de un fluido, para evaluar el rechazo y extrapolar la difusión de moléculas a través de la membrana, ensayo de termogravimetría para determinar la temperatura de degradación y ensayo de espectrofotometría para la determinación de la absorbancia/transmitancia al espectro visible.

3. NORMATIVA

El procedimiento experimental llevado a cabo para la realización del presente Trabajo Final de Grado (TFG) se ha desarrollado en los laboratorios del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT). En dichos laboratorios ha sido necesario cumplir la normativa vigente a fecha 7 de julio de 2017 conforme al Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT).

- **Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales**, cuyo objetivo es *“establecer un adecuado nivel de protección de la salud de los trabajadores frente a los riesgos derivados de las condiciones de trabajo”*.

- **Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual**, cuyo objeto es establecer *“las disposiciones mínimas de seguridad y de salud para la elección, utilización por los trabajadores en el trabajo y mantenimiento de los equipos de protección individual”*.

- **Real Decreto 374/2001, de 6 de abril, sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo**, cuyo objeto es *“establecer las disposiciones mínimas para la protección de los trabajadores contra los riesgos derivados o que puedan derivarse de la presencia de agentes químicos en el lugar de trabajo o de cualquier actividad con agentes químicos”*.

- **Real Decreto 379/2001, de 6 de abril, por el que se aprueba el Reglamento de almacenamiento de productos químicos y sus instrucciones técnicas complementarias MIE APQ-1, MIE APQ-2, MIE APQ-3, MIE APQ-4, MIE APQ-5, MIE APQ-6 y MIE APQ-7**. Dicho reglamento tiene por objeto, *“establecer las condiciones de seguridad de las instalaciones de almacenamiento, carga, descarga y trasiego de productos químicos peligrosos”*.

- **Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006**.

- **Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados**. Dicha ley contiene las definiciones, la clasificación y la lista europea de residuos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sustancias

La principal limitación a la hora de elegir el polímero que se usará para el método experimental es que debe ser un material biocompatible, ya que lo que se pretende es simular tejido renal. Además, debe ser un polímero que sea capaz de disolverse en numerosos solventes, ya que éste también debe cumplir ciertos requisitos para que pueda ser usado en esta aplicación. Dichos requisitos son que no sean tóxicos, que no sean halogenados y que tengan una temperatura de fusión lo suficientemente baja como para poder congelar la disolución polimérica que se preparará a partir del polímero y el solvente seleccionados.

Por ello, al comienzo del método experimental se propusieron dos polímeros y un solvente para cada uno de ellos, como se muestra en la tabla 2, de acuerdo a las evidencias encontradas en diferentes fuentes bibliográficas de revisión, así como en bases de datos literarias sobre características y propiedades de materiales poliméricos (Brandrup, J., 1975).

Tabla 2. Polímero/Solvente/No-solvente propuestos para su uso en el método experimental

POLÍMERO [Fabricante]	SOLVENTE [Fabricante]	NO-SOLVENTE
Policaprolactona (PCL) [Polysciences]	Acetona [Scharlau]	Agua
Poliestireno (PS) [Sigma-Aldrich]	Tetrahidrofurano (THF) [Sigma-Aldrich]	Agua

Al realizar varios experimentos con la disolución polimérica de poliestireno al 20% w/w, se comprobó que la temperatura de fusión del tetrahidrofurano era demasiado alta (-108,4°C), por lo que se tuvo que prescindir de esta disolución, ya que era difícil operar con esta, pues no se congelaba ni en el ultracongelador a -80°C ni con hielo seco, por lo que no se podían obtener resultados de estas experiencias.

Finalmente, se decidió operar con el sistema ternario PCL/acetona/agua, pues la PCL ha sido utilizada en multitud de aplicaciones por su biocompatibilidad y su estabilidad química en ambiente acuoso, debido a su carácter considerablemente hidrófobo. La disolución polimérica de partida se compone de policaprolactona al 17% en acetona, una concentración cercana al límite de saturación, estudiándose posteriormente otros valores de concentración menores.

4.2. Material de laboratorio

- Frasco de vidrio Pyrex 250 ml
- Cuchara de sólidos
- Agitador magnético 15 mm
- Vaso de precipitados 50 ml
- Guantes térmicos de protección
- Gafas de seguridad
- Rasqueta
- Troquel

- Pipeta Pasteur
- Tetina de goma
- Placa de vidrio
- Hoja de teflón 1 mm
- Placa de teflón 1 cm
- Pinzas abatibles
- Dewar
- Caja de poliestireno expandido
- Jeringuilla de 1 ml
- Termopar
- Pipeta automática
- Mechero Bunsen
- Martillo
- Portaobjetos de vidrio
- Recipiente de metacrilato
- Placa Petri de poliestireno
- Parafilm
- Bolsas zip
- Hoja de latón 1 mm
- Vial de vidrio
- Manómetro
- Placa de cultivo

4.3. Equipos

- Balanza de precisión (Sartorius BP211D)
- Agitador
- Desecador de vacío
- Estufa climática (J.P. Selecta, s.a., cod. 2005161)
- Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) (JEOL, JSM6300)
- Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) (ZEISS, ULTRA55)
- Ultracongelador
- Congelador
- Termopar
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC) (Perkin Elmer, DSC 8000)
- Termogravímetro (Mettler Toledo, TGA/DSC1)
- Baño de ultrasonidos
- Válvula de bola
- Espectrofotómetro (THOR LABS M00320149)
- Equipo de medida de la permeabilidad de fabricación propia

4.4. Método experimental

4.4.1. Estudio del equilibrio PCL/acetona/agua

La obtención de puntos para la elaboración de la curva bimodal de un diagrama ternario se realiza mediante una volumetría cualitativa, por el cambio de fase que se produce al añadir un componente a una solución binaria. En este caso, se realiza el diagrama ternario de PCL/acetona/agua a temperatura ambiente (25°C) para obtener información del sistema que se va a generar en la fabricación de las membranas de PCL.

El montaje utilizado para ello se basa en un vial provisto de una tapa para evitar la pérdida de solventes por evaporación (en concreto de la acetona, que evapora fácilmente por su alta presión de vapor). En el vial se introduce un pequeño agitador magnético para mantenerlo en agitación durante todo el ensayo. Además, estará presente un termopar para controlar la temperatura (ya que un diagrama ternario determinado varía con la temperatura), y una balanza de precisión (Sartorius BP211D) para medir la masa añadida en cada momento. Los pasos a realizar para la elaboración del diagrama ternario definido anteriormente son los siguientes:

- En el vial se introduce una masa inicial de la disolución polimérica (PCL y acetona) de porcentaje en peso conocido (17%w/w), se tapa y se mantiene en agitación durante todo el ensayo.
- Por la tapa del vial se inyecta, con una jeringuilla de 1mL, no-solvente (agua) hasta que se observe un cambio de fase, entonces se anota el cambio de fase observado y la masa añadida de no-solvente al sistema tricomponente. Las diferentes fases encontradas durante la realización del experimento fueron líquido transparente (1 fase), líquido turbio por efecto de una suspensión coloidal (2 fases) y líquido transparente + sólido viscoso precipitado (2 fases diferenciadas), si bien las más frecuentes eran las dos primeras.
- A continuación, se inyecta el solvente (acetona) con una jeringuilla de 1mL hasta invertir un cambio de fase, el cual se anota y se pesa en la balanza la masa añadida de solvente.
- Se repiten alternativamente estos dos últimos pasos para obtener varios puntos del diagrama ternario y poder realizar una buena representación.

Cabe destacar que, puesto que un diagrama ternario es la representación bidimensional de un sistema con tres ejes de coordenadas, no se trata de una proyección lineal y, por tanto, las distancias entre diferentes puntos con fracciones másicas escaladas no son proporcionales. Esto hace que la mayor parte de los datos se agreguen en determinadas regiones del diagrama ternario.

4.4.2. Experimentos previos

Se planteó la fabricación de membranas mediante la técnica de inversión de fase. Esta técnica consiste en la transformación de una disolución polimérica (fase líquida) en una membrana (fase sólida). Y, abarca cuatro técnicas diferentes para realizar la inversión de fase, partiendo de la misma base.

➤ Técnica de inversión de fase – precipitación por inmersión

Inicialmente, se propuso realizar la precipitación por inmersión. Es decir, poner disolución polimérica (polímero + solvente) en un soporte liso y, a continuación, sumergirlo en un baño de un no-solvente del polímero. El solvente contenido en la disolución se mezcla con el no-solvente del baño formando una disolución solvente + no-solvente en mayor proporción de no-solvente, por lo que el polímero precipita. Además, los poros generados se deben al lugar que ocupaba el solvente durante la separación de fases. Se procedió de la siguiente forma para la obtención de membranas:

- Con la ayuda de una pipeta, se pusieron unas gotas de disolución PCL + acetona sobre un portaobjetos de vidrio.
- Se puso otro portaobjetos encima para homogenizar la disolución, deslizándolo sobre el que contenía la disolución.
- Con el portaobjetos en horizontal, se sumergió lentamente en un baño de agua destilada a temperatura ambiente y, se mantuvo durante 30min.
- Transcurrido el tiempo, se introdujo la membrana ya precipitada en un vaso de precipitados con agua destilada durante 24 h para eliminar posibles restos de solvente. Se cambió el agua ya que la del primer baño contenía una pequeña concentración de acetona.
- Transcurridas las 24 h, la membrana obtenida se dividió en dos. Una se mantuvo bajo campana durante 24 h para que se evaporase el agua y, la otra se puso en un desecador a vacío durante 10 min para posteriormente, observar las diferencias obtenidas.

➤ Técnica de inversión de fase – precipitación de la fase vapor

Esta técnica consiste en colocar la disolución polimérica sobre un soporte e introducirla en un ambiente saturado de un no-solvente del polímero en fase vapor. Debido a la elevada concentración del solvente en la atmósfera de vapor, éste permanece en la disolución en vez de evaporarse. El no-solvente difunde hacia la disolución generando el intercambio con el solvente. El procedimiento experimental fue el siguiente:

- Se preparó el ambiente saturado de no-solvente. Para ello, se introdujo un vaso de precipitados con agua destilada en un recipiente sellable de metacrilato. Éste, a su vez, se introdujo en una estufa a 37 °C durante 24 h para asegurar que se había alcanzado el equilibrio y que la humedad relativa dentro del recipiente de metacrilato era del 100%.
- Se colocaron unas gotas de la disolución PCL + acetona sobre un portaobjetos. Se homogenizó deslizando otro portaobjetos sobre el que contenía la disolución. Esto se realizó en un ambiente con acetona en fase vapor para evitar la pérdida de ésta en la disolución debido a su elevada volatilidad. Para generar el ambiente de acetona, simplemente se depositó la disolución sobre el portaobjetos sobre un vaso de precipitados que contenía acetona.
- Se introdujo el portaobjetos que contenía la disolución en el recipiente de metacrilato durante 24 h, cuya atmósfera estaba saturada en agua.
- Pasadas 24 h, se obtuvo la membrana preparada por precipitación de la fase vapor.

➤ Técnica de inversión de fase – precipitación por inmersión en frío (de -20°C a -80°C)

Esta técnica surge como innovación en base a la técnica *freeze-extraction*. Consiste en poner disolución polimérica sobre un soporte y, posteriormente congelarla gradualmente, primero a -20 °C y después a -80 °C. Una vez congelada, se sumerge en un baño de no-solvente del polímero para que se produzca el intercambio. El procedimiento experimental fue el siguiente:

- Sobre una placa de vidrio, se colocó una placa de teflón de 1 mm de espesor con un recorte cuadrado en el centro.
- Sobre el molde cuadrado, se colocó una placa de teflón de 1 mm de espesor a la que, previamente, se le troquelaron dos agujeros (punto de inyección y punto de venteo).
- Se fijó la placa de vidrio y la de teflón que contenía el recorte con una pinza a cada lado.
- Con una pipeta, se inyectó disolución de PCL + acetona por uno de los agujeros hasta que rebosó por el otro. La finalidad de esta tapa de teflón era disminuir la pérdida de acetona por evaporación mientras se está inyectando la disolución.
- Todo ello, se introdujo en un congelador a -20 °C durante 30 min (tiempo suficiente que asegurase que se había alcanzado el equilibrio). Inmediatamente después, se trasladó a un ultracongelador a -80 °C durante un mínimo de 3 h para alcanzar el equilibrio térmico (preferiblemente, 12 h).
- Cuando la muestra ya estaba a una temperatura homogénea, se retiraron las pinzas, la tapa de teflón y la placa recortada. Se sumergió la placa de vidrio que contenía la disolución congelada en un baño de agua destilada durante 30 min.
- Pasados 30 min, se extrajo la membrana y se depositó en un vaso de precipitados con agua durante 24 h para eliminar posibles restos de acetona.
- Por último, se depositó en una placa Petri y se dejó evaporar el agua durante 24 h.

➤ Técnica de inversión de fase – precipitación por inmersión en frío con N₂ líquido

Esta técnica, muy similar a la anterior, se diferencia en la velocidad de congelación de la disolución polimérica. En esta, se propuso congelar la disolución más rápidamente con N₂ líquido, ya que alcanza una temperatura aproximada de -196 °C en cuestión de pocos minutos, mientras que en la anterior, la velocidad de congelación era mucho más lenta y gradual.

Por tanto, el procedimiento experimental fue idéntico al anterior excepto en la etapa de congelar. En este caso, la disolución contenida en la placa de vidrio se introdujo en una caja de poliestireno expandido, se vertieron 500 ml de N₂ líquido que se mantuvieron durante 15 min, para asegurar la congelación de la disolución.

➤ Técnica de inversión de fase – precipitación con hidrogeles

Esta técnica surge como innovación al método de precipitar membranas. Se trata de poner disolución polimérica sobre una lámina delgada de hidrogel y, sobre éste, otro hidrogel. Se entiende por hidrogel en este caso un retículo tridimensional macromolecular que retenga considerables

cantidades de agua sin disolverse en ésta. El propósito es eliminar el gradiente de concentración que se genera en las técnicas expuestas anteriormente, debido a que de esta forma el no-solvente contenido en el hidrogel estará presente en ambos lados de la disolución. Para ello:

- Se colocó una lámina delgada de hidrogel de alginato sódico (Sigma-Aldrich) 1% coagulado con CaCl_2 (Fluka) 0.2M sobre la placa de vidrio y, sobre éste la placa de teflón recortada. Dichas placas se fijaron con una pinza a cada lado.
- Con una pipeta, se inyectó disolución de PCL + acetona sobre el hidrogel situado sobre la placa de vidrio. A continuación, se puso otra lámina de hidrogel sobre la disolución.
- Se mantuvo así durante 30 min, tiempo suficiente que asegurase que se había producido el intercambio acetona-agua.
- Pasados 30 min, se depositó la membrana en un vaso de precipitados con agua destilada durante 24 h. Después, se extrajo sobre una placa Petri que se mantuvo destapada durante 24 h con el fin de evaporar el agua.

➤ Mejoras sobre los experimentos previos

Se consideró sustituir el uso de la tapa de teflón por una tapa de latón, ya que posee mayor conductividad térmica y se pensó que probablemente facilitaría la orientación de los poros en una dirección preferencial. Además, ya que se requiere obtener una membrana con una gran superficie y un espesor dentro de un rango de 200-300 μm , se utilizó una placa de teflón de 1 cm de espesor como soporte para formar moldes. En ella, se fresaron nueve moldes de 3.5x3.5 cm^2 de superficie, tres de ellos con un espesor de 300 μm y los seis restantes con un espesor de 200 μm . Esta placa de teflón sustituía a la placa de vidrio + molde de teflón que se utilizaba en un principio. Además, se fabricó otra tapa de latón que permitiera inyectar la disolución polimérica en tres moldes a la vez de 14x5.2 cm^2 .

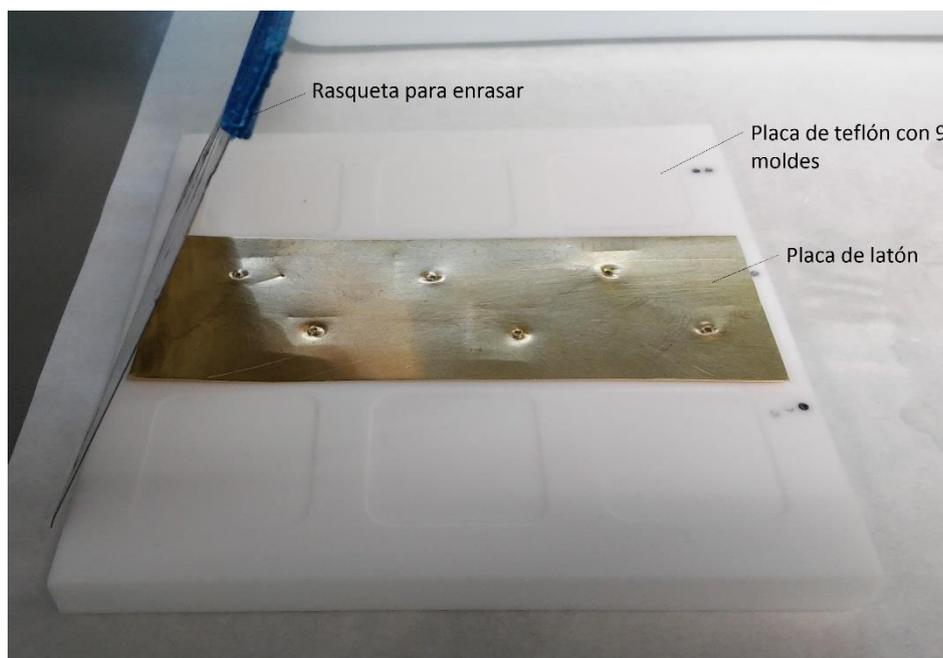


Ilustración 7. Montaje para enrasar la disolución

Una vez la disolución estaba preparada para introducirla en el baño de coagulación, se retiraba la tapa que evitaba que se evaporara el solvente. Para ello, se disponía una rasqueta inclinada apoyada en los bordes superiores de la placa de teflón, entonces se deslizaba lentamente la rasqueta para retirar la tapa de latón. Este montaje aparece en la ilustración 7.

4.4.3. Diseño de experimentos

Una vez se adquirió experiencia acerca de la puesta a punto y fabricación de membranas, se planteó realizar un diseño de experimentos que permitiese cribar diferentes niveles de los factores que mostraban ser los más cruciales para las propiedades de interés de las membranas, puesto que en bibliografía se observó que había una gran cantidad de factores que podían afectar a las propiedades y los poros de diferentes membranas de una misma composición (Vankelecom et al., 2005).

Un diseño de experimentos es una técnica estadística que permite estudiar la influencia de los factores sin tener que estudiarlos uno a uno por separado, es decir, sin realizar un experimento por cada combinación posible variando un factor, permaneciendo el resto fijos. Sin embargo, el principal inconveniente del diseño de experimentos es que se hace necesario obtener resultados de las variables de salida para todos o casi todos los experimentos ya que éste se basa en la compensación de los efectos de los factores para poder prescindir de algunos experimentos. Dicho de otro modo, esta técnica es muy sensible a que falten datos a la hora de analizar los resultados.

Inicialmente se plantearon tres diseños de experimentos diferentes, como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Propuestas para el diseño de experimentos

	Factores	Nº membranas
Diseño factorial completo 3^k	Precipitación (discreto): RT/-80/N ₂ T _{baño} (continuo): 5°C-50°C Concentración (continuo): 5%-17%	27
Diseño de matriz ortogonal de Taguchi	Precipitación (discreto): RT/-80 T _{baño} (continuo): 5°C-50°C Concentración (continuo): 5%-17%	18
Cuadrados latinos	Precipitación (discreto): RT/-80/N ₂ T _{baño} (discreto): 5°C/25°C/50°C Concentración (discreto): 5%/12%/17%	9

El diseño factorial completo 3^k permite estudiar el efecto de cada factor sobre las variables de salida (al igual que el resto de diseños propuestos) y, además, permite estudiar el efecto de las interacciones entre factores sobre las variables de salida. Sin embargo, se descartó ya que requería un elevado número de membranas. Por otro lado, el diseño de matriz ortogonal L18 de Taguchi también permite estudiar todo lo anterior pero se descartó porque requería, por su configuración, prescindir de uno de los niveles del factor de la variable discreta, ya sea la precipitación por inmersión o la congelación (con N₂ líquido o de -20 °C a -80 °C) y posterior precipitación por inmersión. Otros modelos válidos de matriz ortogonal requerían incluso más membranas producidas (con lo cual no suponían una mejora respecto

del anterior), o no eran aplicables sin discriminar uno de los factores por completo. Por tanto, por simplicidad, teniendo en cuenta que el objetivo principal era hacer un cribado amplio, se decidió realizar un diseño de experimentos en cuadrados latinos. Este procedimiento distribuye los diferentes niveles de los factores en una matriz cuadrada de N elementos, donde la única restricción es que haya tantos factores como niveles por factor (N), circunstancia que se cumplía en este caso. Aunque el diseño elegido tiene como inconveniente tener que considerar todos los factores como discretos y que no permite el estudio del efecto de las interacciones entre factores, se escoge éste ya que no requiere realizar un elevado número de membranas que después habrá que caracterizar. Además, el efecto de las interacciones es de interés mínimo en este caso, ya que lo que se pretende es conocer las condiciones óptimas de la técnica de inversión de fase para obtener los resultados deseados.

Por ello, se realizó un planteamiento de diseño de experimentos mediante el software informático de análisis estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies) que propuso la fabricación de nueve membranas con los parámetros que se especifican en la tabla 4.

Tabla 4. Relación de conjunto de parámetros fijados para las 9 membranas fabricadas de acuerdo al diseño de experimentos por cuadrados latinos

	Precipitación	Temperatura del baño	Concentración
D1	RT	25	17
D2	N ₂	7	17
D3	-80	7	13
D4	RT	7	8
D5	RT	50	13
D6	-80	25	8
D7	N ₂	25	13
D8	-80	50	17
D9	N ₂	50	8

En la columna “Precipitación” se indica si la disolución polimérica fue congelada antes de la precipitación o no. Si no se congeló se muestra como “RT”, si se congeló con N₂ líquido, “N₂” y si se congeló lentamente, primero a -20 °C y después a -80 °C, se muestra como “-80”.

En la columna “Temperatura del baño”, se indican las tres temperaturas diferentes que se seleccionaron como variables discretas para la temperatura del baño de agua destilada donde se realizó la precipitación.

Por último, en la columna “Concentración” se muestran las tres concentraciones, en fracción másica porcentual, de la disolución polimérica de partida que se seleccionaron como variables discretas.

Los valores máximo y mínimo de “temperatura del baño” y de “concentración” se escogieron con el fin de ofrecer un amplio rango de valores, dentro de los que son físicamente válidos, de los que permiten manipular el sistema, y de la propia experiencia obtenida durante las pruebas preliminares.

A continuación, se detalla el procedimiento que se llevó a cabo para la realización de las membranas del diseño de experimentos.

➤ Inyección de la disolución polimérica

Para la fabricación de membranas con la técnica de precipitación por inversión de fase se parte de una disolución polimérica (polímero y solvente). Este primer paso es determinante para la forma final que tendrá la membrana, ya que donde se deposite la disolución polimérica será donde se realice la posterior precipitación y con ello, la obtención de la membrana. Los pasos a seguir para la preparación de la disolución fueron los siguientes:

- Se recortó un trozo de latón de 5.2x14 cm que sirvió de tapa para evitar la evaporación del solvente contenido en la disolución polimérica. Con la ayuda de un troquel y un martillo se realizaron seis agujeros sobre la placa de latón. A una distancia tal que dos de ellos queden situados sobre un molde de teflón, otros dos sobre el molde más cercano al primero y, los dos últimos sobre el molde próximo al segundo.

- La tapa de latón fabricada se colocó sobre la placa de teflón.

- Con la ayuda de una pipeta Pasteur y una tetina de goma se inyectó la disolución polimérica por uno de los agujeros hasta que desbordase por el otro agujero del mismo molde. Se realizó lo mismo en los otros dos moldes que estaban cubiertos por la tapa de latón.

- En caso de no congelar la disolución, una vez se había inyectado la disolución se retiraba la tapa de latón con la ayuda de una rasqueta. Ésta se colocaba inclinada sobre la placa de teflón y se iba deslizando hasta retirar la tapa de latón, como se puede observar en la ilustración 8 (apartado 4.4.2). El exceso de disolución en cada molde se retiró y se recogió con un papel, de forma que quedaba enrasado.

- Por el contrario, si posteriormente se congelaba la disolución, una vez se había inyectado la disolución se ponía una pinza abatible en cada lado de la placa de teflón para inmovilizar la tapa de latón y evitar la evaporación del solvente durante la congelación.

➤ Congelación de la disolución polimérica y precipitación de la membrana

Una vez introducidas las optimizaciones de la tapa de latón, la plancha para enrasar y el molde de teflón se procedía análogamente a como se describía en cada uno de los apartados correspondientes a las diferentes variables del método de inversión de fase.

Con las nuevas mejoras, se procede análogamente a lo ya descrito para precipitar.

4.4.4. Ensayos de caracterización de las membranas del diseño de experimentos

4.4.4.1. Ensayo de microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM)

Mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM, por sus siglas en inglés), es posible obtener imágenes microscópicas de la topografía de las muestras, tanto longitudinales como de cortes transversales, permitiendo observar tanto la estructura de la superficie como del interior de las membranas. Para ello, es necesario preparar las muestras previamente, puesto que son altamente porosas y no son conductoras eléctricas. El procedimiento a seguir para cada muestra fue el siguiente:

- Se seleccionó un trozo de unos 0.5x0.5 cm² y se introdujo en un vaso con N₂ líquido durante 2-3 min, tiempo suficiente para que la muestra atravesase la temperatura de transición vítrea (sobre -60 °C para el caso de la PCL).

- El trozo cogido con pinzas, se fracturó con la ayuda de otras pinzas. Uno de ellos, se depositó en el portamuestras transversal y el otro, en el portamuestras longitudinal, a los que previamente se les había adherido cinta de carbono.

La fractura de la muestra se realizó mediante fractura frágil para poder observar la estructura original y evitar deformaciones durante ésta.

- Una vez estaban todas las muestras en los portamuestras correspondientes, se realizó una pulverización con Au metálico. Este paso es imprescindible, ya que se trata de muestras porosas y no conductoras. El oro, que es conductor y de peso atómico elevado, se depositó sobre la superficie y poros de las muestras. De esta manera, se consiguió incrementar la señal del detector ya que los electrones emitidos por el FESEM colisionaban sobre los átomos de oro.

- Llegados a este punto, las muestras estaban preparadas para introducir las en el FESEM. Fijando el potencial a 2 kV, se comenzó a realizar imágenes de las muestras a diferentes aumentos en función de lo que se quería caracterizar. A pocos aumentos se observaba el espesor de la membrana y, al ir aumentando se conseguía caracterizar la forma y distribución de los poros.

4.4.4.2. Ensayo de porosidad

La forma de los poros en las membranas obtenidas por precipitación por inmersión está bastante definida pudiéndose obtener la porosidad de éstas mediante análisis de imagen. Por otro lado, la forma de los poros de las membranas obtenidas por precipitación por inmersión en frío es algo más compleja, de forma que se obtienen mejores resultados realizando el ensayo de porosidad por medidas gravimétricas y cálculo del volumen libre de los poros.

➤ Ensayo de porosidad con ayuda de métodos de análisis de imagen

Este tipo de ensayo de porosidad se realiza a las muestras D1, D4 y D5.

Para las muestras D1 y D5, se calcula la porosidad utilizando la ecuación 3:

$$\pi (\%) = \frac{e_p - e_{PCL}}{e_p} \cdot 100 \quad (3)$$

Donde en esta expresión, e_p es el espesor de la membrana, es decir, de la PCL y los poros generados y e_{PCL} es el espesor teórico que tendría la PCL si no se generaran los poros.

Para determinar el espesor de las muestras, e_p , se utiliza el programa informático "ImageJ (National Institutes of Health, EEUU)" a partir de las imágenes tomadas en FESEM. Para ello:

- Se carga la imagen en el programa y se establece la escala relacionando píxeles con micrómetros.

- Se mide el espesor de la membrana para cada una de las imágenes tomadas en FESEM, obteniendo el espesor promedio para cada muestra (e_p).

El espesor teórico de la PCL sin poros, e_{PCL} , se calcula a partir de la ecuación 4.

$$e_{PCL} = \frac{V_{PCL}}{A_{dis}} \quad (4)$$

Donde,

V_{PCL} es el volumen de PCL que contiene la disolución polimérica en el molde de teflón

A_{dis} es el área del molde de teflón, que es de $3.5 \times 3.5 \text{ cm}^2$ como se mostró en el apartado 4.4.3.

A su vez, V_{PCL} se calcula mediante la ecuación 5.

$$V_{PCL} = \frac{m_{PCL}}{\rho_{PCL}} \quad (5)$$

Donde,

m_{PCL} es la masa de PCL en la disolución polimérica

ρ_{PCL} es la densidad de la PCL, y es 1145 kg/m^3

La masa de PCL (m_{PCL}) se calcula con la ecuación 6.

$$m_{PCL} = m_{dis} \cdot \omega_{PCL} \quad (6)$$

Donde,

m_{dis} es la masa de disolución inyectada en el molde de teflón

ω_{PCL} es la fracción másica de PCL en la disolución

La masa de disolución (m_{dis}) se calcula a partir de la ecuación 7 suponiendo que la densidad de la disolución es igual a la densidad de la acetona.

$$m_{dis} = \rho_{dis} \cdot V_{dis} \quad (7)$$

ρ_{dis} es la densidad de la disolución polimérica que, suponiendo que es la misma que la densidad de la acetona, vale 789 kg/m^3

V_{dis} es el volumen de la disolución que se halla a partir de las dimensiones del molde de teflón, que son $3.5 \times 3.5 \text{ cm}^2$ de superficie y $200 \text{ }\mu\text{m}$ de espesor.

Otra alternativa similar a este ensayo es la medida del área de cada poro y de la sección transversal de la muestra con la ayuda del programa informático "ImageJ (National Institutes of Health, EEUU)". Este tipo de ensayo se realizó para la muestra D4 para minimizar errores en el resultado, ya que tiene un espesor muy inferior al resto de muestras, y finas películas de agua adsorbidas a la superficie de las membranas podían dar lugar a una excesiva variabilidad en el procedimiento que se describe en el siguiente apartado. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

- Se cargó la imagen en el programa y se estableció la escala relacionando píxeles con micrómetros.
- Se seleccionaron y trazaron manualmente, uno por uno, los poros que se observaron en la imagen. Por último, se seleccionó la muestra completa.
- El programa calculó el área de cada sección que se había realizado. Por último, se calculó la porosidad a partir de la ecuación 8.

$$\pi (\%) = \frac{\sum_i A_i}{A_T} \cdot 100 \quad (8)$$

Donde,

π es la porosidad

A_i es el área de cada poro i

A_T es el área transversal de la membrana

Estos pasos se realizaron para todas ($N=4$) las imágenes tomadas en FESEM. De esta forma, la porosidad para cada muestra fue la media del valor de porosidad obtenido en cada una de las imágenes.

➤ Ensayo de porosidad a partir de medidas de masa

Este tipo de ensayo de porosidad se realiza a las muestras D2, D3, D6, D7, D8 y D9 que son las que se han fabricado por precipitación por inmersión en frío.

El ensayo de porosidad requiere un análisis gravimétrico de cada una de las muestras. Será necesario realizar dos medidas por cada muestra. Una de la estructura porosa en aire ($m_{PCL, seco}$) y, otra de la estructura de PCL con los poros repletos de agua ($m_{PCL, mojado}$). Para ello, se llevó a cabo el siguiente procedimiento para cada una de las muestras:

- Se seleccionó una zona representativa de unos $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$.
- Se midió su masa en una balanza de precisión, ésta es la que se denominó $m_{PCL, seco}$

- Dicha muestra se introdujo en una jeringuilla, se tapó la boquilla y se introdujeron unos 15 ml de agua miliQ (agua tipo 1).
- Dándole la vuelta a la jeringa, se retiró la tapa y se dejó escapar el aire. Cuando estaba completamente llena de agua se puso la tapa.
- Se hizo el vacío de forma que se evacuase el aire y los poros quedasen repletos de agua. Esto se repitió de 4 a 8 veces según la muestra.
- Se extrajo la muestra y se retiró el agua superficial.
- Entonces, se midió la masa de la estructura con los poros llenos de agua en una balanza de precisión, ésta se denominó $m_{PCL, mojado}$

A partir de estos datos y conociendo la densidad de la PCL (1145kg/m^3) y del agua a la temperatura de trabajo, es posible determinar la porosidad de cada muestra a partir de la ecuación 9 que se muestra:

$$V_{\text{poro}} = \frac{m_{PCL,mojado} - m_{PCL,seco}}{\rho_{H_2O}}$$

$$V_{PCL} = \frac{m_{PCL,seco}}{\rho_{PCL}}$$

$$\pi = \frac{V_{\text{poro}}}{V_{\text{poro}} + V_{PCL}} \quad (9)$$

Donde,

ρ_{H_2O} es la densidad del agua a la temperatura de trabajo, en kg/m^3

ρ_{PCL} es la densidad de la PCL, en kg/m^3

π es la porosidad de cada muestra de membrana

4.4.4.3. Ensayo de manipulabilidad

Los ensayos de manipulabilidad se realizan de manera cualitativa, por ser esta una variable de gran relevancia, pero no poderse determinar con un equipo ni dispositivo técnico. En éstos se estudiará la manipulabilidad con pinzas a tracción y a torsión. Además, se determinará el área máxima obtenida de cada membrana con respecto al área que tenía la ranura donde se dispensaba la disolución polimérica.

Para ello, se fijan cinco niveles de descripción para cada uno de los tres ensayos. Se encuesta a un número $N=7$ de investigadores del CBIT con experiencia en el uso y manipulación de este tipo de materiales. Cada uno de ellos deberá decidir qué nivel asociarle a cada membrana en cada uno de los ensayos mencionados anteriormente.

Además, los niveles de descripción para cada ensayo son los que se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Niveles de descripción para los ensayos de manipulabilidad

Manipulabilidad con pinzas a tracción y a torsión	
Nivel 1	Se fractura al cogerla con pinzas
Nivel 2	Se fractura al aplicar poca fuerza
Nivel 3	Se fractura al aplicar una fuerza intermedia
Nivel 4	Se fractura al aplicar mucha fuerza
Nivel 5	No se fractura
Área máxima respecto al molde de teflón	
Nivel 1	1/5, el área máxima de la membrana es 1/5 el área del molde
Nivel 2	2/5, el área máxima de la membrana es 2/5 el área del molde
Nivel 3	3/5, el área máxima de la membrana es 3/5 el área del molde
Nivel 4	4/5, el área máxima de la membrana es 4/5 el área del molde
Nivel 5	5/5, el área de la membrana es igual al área del molde

4.4.5. Ensayos de caracterización de las membranas óptimas

Una vez se obtuvieron los resultados del diseño de experimentos, es decir, se determinaron las membranas que poseen unas propiedades óptimas, se procedió a realizar ensayos de caracterización con tal de ampliar la información previa obtenida en los ensayos de caracterización de las membranas del diseño de experimentos.

4.4.5.1. Ensayo de espectrofotometría visible

El ensayo de espectrofotometría se realizó para la determinación de la transmitancia, con el objetivo de determinar la transparencia de las membranas en el rango de longitudes de onda que va desde el espectro visible hasta el infrarrojo cercano. Además, este ensayo también se realizó para una membrana de policarbonato poroso como referencia, porque era una comercial. El espectrofotómetro compara la radiación absorbida de una muestra con la radiación del medio en ausencia de ésta. Las medidas de transmitancia se realizaron para las dos membranas que resultaron ser las óptimas en dos medios diferentes, en aire y en medio acuoso, siendo ésta última más interesante ya que la membrana estará sumergida en un medio fluido en condiciones de operación. Para ello, en aire se realizaron los siguientes pasos con ambas muestras:

- Se colocaron dos portaobjetos de vidrio, uno encima de otro, sobre un soporte conectado a un detector fotosensible (THOR LABS M00320149) que registraba la transmitancia a diferentes longitudes de onda. Estas medidas fueron las de referencia.
- Se seleccionó una muestra de la membrana de unos 0.5x0.5 cm y se colocó sobre un portaobjetos. Sobre ella, se colocó otro portaobjetos para que la muestra quedara completamente aplanada y su curvatura no afectara a las medidas.

Posteriormente, se realizaron las medidas de transmitancia en medio acuoso de la siguiente manera:

- Sobre un portaobjetos se depositaron unas gotas de agua miliQ con una jeringuilla y, se colocó otro portaobjetos encima. Se realizaron las medidas con este sistema, que se tomó como el de referencia en medio acuoso.

- La muestra a la que anteriormente se le realizaron las medidas de transmitancia en aire, se introdujo en una jeringuilla con agua miliQ. Dándole la vuelta a ésta se extrajo el aire y se tapó la boquilla. Desplazando el émbolo varias veces se consiguió introducir agua miliQ en los poros de la membrana, desplazando el aire ocluido.

- Dicha muestra con los poros repletos de agua se depositó sobre un portaobjetos, se pusieron unas gotas de agua miliQ y, otro portaobjetos sobre la muestra. Se registraron las medidas de transmitancia de la muestra en medio acuoso.

4.4.5.2. Ensayo de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una herramienta de análisis de las propiedades térmicas de un material. Su fundamento se basa en medir el flujo de calor emitido o consumido por una muestra en un barrido de temperaturas con respecto a una referencia.

El ensayo de Calorimetría Diferencial de Barrido, permitió determinar si se habían producido o no cambios, durante la disolución y posterior precipitación, en la temperatura de transición vítrea y el porcentaje de cristalinidad con respecto a la policaprolactona en granza. Para ello, se llevó a cabo el siguiente procedimiento experimental, para la policaprolactona y las dos membranas óptimas:

- Se introdujo una cápsula de aluminio perforada con una masa de muestra entre 5 y 10 mg y otra cápsula vacía (referencia) en el módulo del DSC.

- Se realizó un proceso inicial para eliminar la memoria térmica del material desde 30 °C hasta 120 °C. Posteriormente, se enfrió la muestra hasta -80 °C y se realizó un segundo calentamiento de -80 °C hasta 120 °C. Todos los procesos se realizaron a una velocidad de 20 °C/min.

4.4.5.3. Ensayo de permeabilidad

Se consideró la realización de un ensayo de permeabilidad a las membranas óptimas del diseño de experimentos, con el fin de determinar si la porosidad es suficiente como para no dificultar el tránsito de fluido y moléculas disueltas en este a través de la membrana. Además, este ensayo también se realizó para una membrana de policarbonato poroso como referencia, porque era una comercial. El montaje utilizado constaba de dos tuberías, una válvula, un manómetro y una bomba de agua (Ilustración 8).

- Se realizaron tres réplicas para cada una de las membranas. Se troquelaron con la forma y dimensiones de la tubería, con un troquel de 18 mm y con la ayuda de un martillo.

- Una vez la muestra estaba preparada, se colocó al final de la tubería por la que circula el agua impulsada por la bomba, entre dos juntas de goma, de diámetro interno ligeramente inferior a la parte porosa de la membrana.

- La bomba de agua se situó en un recipiente con agua, se conectó y, asegurándose que la válvula estaba cerrada, comenzó a aspirar agua por una de las tuberías. Por la otra tubería comenzó a recircular el agua.
- Se fue abriendo lentamente la válvula hasta que estuvo completamente abierta y se anotó la presión.
- Se realizaron tres medidas para cada réplica. Para ello, se pesó un vaso de precipitados en una balanza de precisión (m_{vaso}). Dicho vaso se colocó al final de la tubería por la que circula el agua y se cronometró en 1 min la cantidad de agua que se recogía. Se pesó el vaso y el agua recogida en una balanza de precisión ($m_{\text{vaso}+\text{H}_2\text{O}}$).
- Con los datos tomados, buscando en bibliografía los datos que se muestran en la tabla 6 y a partir de las ecuaciones (10), (11), (12) y (13), es posible determinar la permeabilidad intrínseca (k) y el caudal de fluido que atraviesa la membrana (Q).



Ilustración 8. Montaje del ensayo de permeabilidad

Tabla 6. Datos termodinámicos del agua

ρ (kg/m ³)	997.13
μ (Pa·s)	$0.891 \cdot 10^{-3}$

$$V = \frac{m_{\text{vaso}+\text{H}_2\text{O}} - m_{\text{vaso}}}{\rho} \quad (10)$$

Donde,

V es el volumen de fluido recogido en un tiempo t, en m³

ρ es la densidad del fluido, en kg/m³

$$CWP = \frac{V}{A \Delta p \Delta t} = \frac{Q}{A \Delta p} \quad (11)$$

Donde,

CWP es el máximo flujo alcanzable, en m² s/kg

A es el área de la muestra, en m²

Δp es la diferencia de presión entre cada lado de la membrana, en Pa

Δt es el tiempo de ensayo, en s

Q es el caudal, en m³/s

$$k = - CWP \cdot \mu \cdot L \quad (12)$$

Donde,

k es la permeabilidad intrínseca, en m²

μ es la viscosidad dinámica del fluido, en Pa·s

L es el espesor de la membrana, en m

$$Q = \frac{-kA}{\mu} \cdot \frac{\Delta p}{L} \quad (13)$$

4.4.5.4. Ensayo de termogravimetría (TGA)

El termogravímetro permite evaluar la variación de la masa de una muestra cuando se somete a una rampa de temperaturas. En este caso, se utilizó dicho equipo para la determinación de la temperatura de degradación, tanto de las membranas obtenidas por precipitación por inmersión como para las obtenidas por congelación con N₂ líquido y precipitación por inmersión. Además, se ensayó también la grana de policaprolactona con tal de comparar su resultado con el de las membranas. Los pasos que se siguieron para la realización de dichos ensayos fueron los siguientes:

- Se programó el equipo para que partiera de 30 °C, se mantuviera 3 min a esa temperatura para estabilizarse y, comenzara a aumentar la temperatura a 10 °C/min hasta alcanzar 650 °C. Este procedimiento lo realizó para las cuatro muestras que se mencionan a continuación.

- Se limpiaron cuatro cápsulas de aluminio de 70 μ l calcinándolas con una antorcha de butano y se sumergieron en acetona durante 5 min en un baño de ultrasonidos.
- Se introdujeron las cápsulas en el equipo de TGA y se procedió a su pesada.
- Después de que el equipo pesara las cápsulas, se introdujo una cantidad preferiblemente entre 5 – 10 mg sin que ocupara más de la mitad de la cápsula. Una cápsula se dejó vacía como referencia.
- Se procedió a pesar las muestras, como paso previo a comenzar el ensayo. Cabe destacar que los ensayos se realizaron en ambiente de N₂ puro, con el fin de prevenir que se produjese la degradación térmica del polímero mediada por reacciones de combustión.

4.4.5.5. Ensayo de hinchado en medio salino

Se consideró realizar un ensayo de hinchado en medio salino con tal de determinar si las membranas óptimas resultantes del diseño de experimentos hincharán o no al someterlas a un medio fluido de fuerza iónica y osmolaridad similar al medio fisiológico, ya que estarán sometidas a éste por la aplicación que se le va a dar.

El ensayo se realizó para tres réplicas de cada una de las membranas óptimas con tal de que los resultados fueran reproducibles. El procedimiento experimental que se siguió fue el siguiente:

- Se preparó una disolución al 0.9% de NaCl (99.9%, Panreac). Con una pipeta automática se inyectó dicha disolución en cada uno de los pocillos de una placa multipocillos de poliestireno de 48 pocillos, 1 ml en cada pocillo para cada muestra.
- Se realizaron las pesadas de la masa en seco de todas las muestras en una balanza de precisión (m_o) y se introdujeron en la placa multipocillos que contenía la disolución de NaCl. Tres muestras de cada membrana se dejaron en este medio durante diferentes tiempos entre 0.5 y 24 h.
- Pasado el tiempo considerado para cada una de ellas, se sacaron del medio, se retiró el líquido superficial con papel de filtro y se volvieron a pesar en una balanza de precisión (m_f). Es importante destacar que no se reintrodujeron las membranas en el medio salino una vez pesadas por segunda vez, sino que se utilizaron diferentes fragmentos de membrana para cada punto temporal.
- A partir de los datos tomados, se determinó el contenido de agua en equilibrio (EWC) para cada una de las muestras a diferentes tiempos (Ec. 14).

$$EWC = \frac{m_f - m_o}{m_o} \quad (14)$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudio del equilibrio PCL/acetona/agua

A continuación se muestra en la ilustración 9 los resultados del estudio del equilibrio PCL/acetona/agua en forma de diagrama ternario.

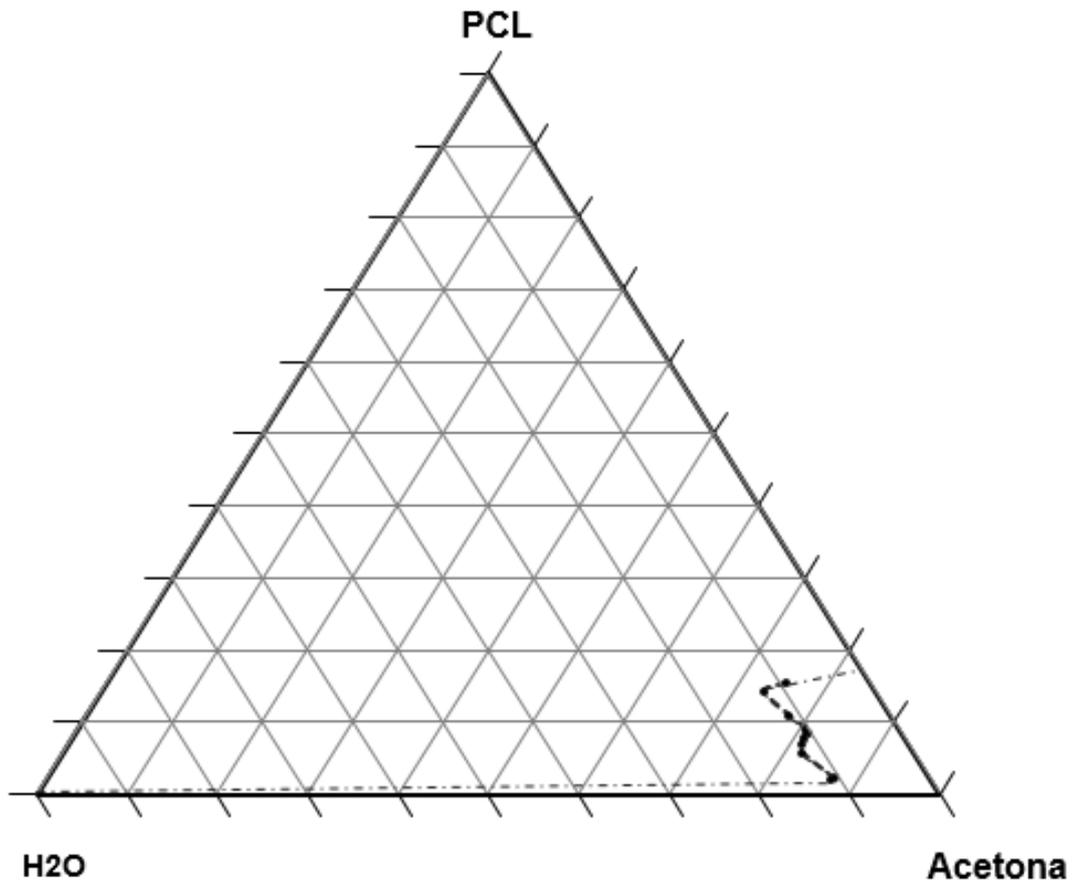


Ilustración 9. Diagrama ternario PCL/acetona/agua. Cada segmento triangular representa un incremento en la fracción másica de 0.1. La línea de puntos es una extrapolación de los datos experimentales

Cada uno de los puntos representados en la ilustración 9 muestra una composición diferente de PCL/acetona/agua donde se produce un cambio de fase en el sistema ternario (de líquido transparente – 1 fase – a suspensión coloidal turbia – 2 fases). Se ha delimitado las distintas áreas que separan dichos puntos mediante la representación de una curva punteada; ésta será la curva bimodal.

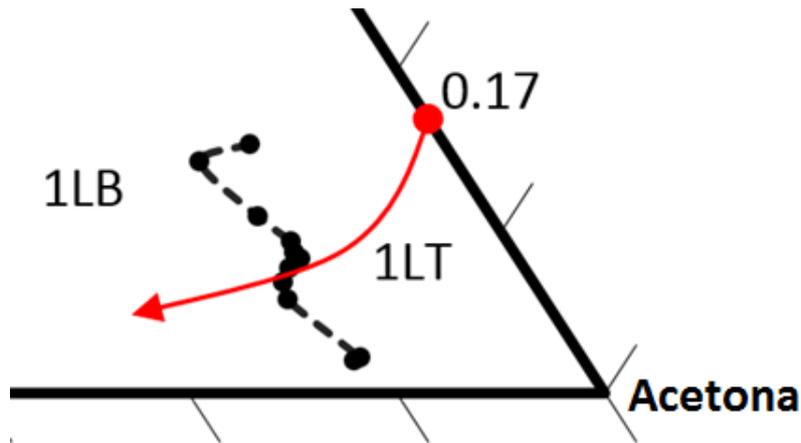


Ilustración 10. Detalle del diagrama ternario PCL/acetona/agua

En el detalle de la ilustración 10, donde se detallan los datos tomados para la elaboración del diagrama ternario, se ha trazado una curva roja que describe la ruta que seguía el sistema binario inicial polímero + disolvente al entrar en contacto con el medio de precipitación. Además, el área denominada “1LT” presenta las composiciones PCL/acetona/agua que hacen que el sistema presente una fase líquida transparente. Al otro lado de la frontera definida de los puntos, se producía una fase líquida blanquecina (1LB), fruto de la precipitación de la PCL en forma de partículas dispersas.

El diagrama ternario PCL/acetona/agua representado en la ilustración 10 corrobora que la acetona actúa de solvente y el agua de no-solvente, pues la curva formada por los puntos experimentales se encuentra en el vértice donde la proporción de acetona es mayor, indicando la presencia de una única fase líquida en ausencia de partículas de PCL precipitadas. Además, a partir del diagrama ternario se puede calcular la cantidad de agua mínima que requiere el sistema para que se produzca la inversión de fase.

5.2. Caracterización preliminar de las técnicas de inversión de fase y sus modificaciones

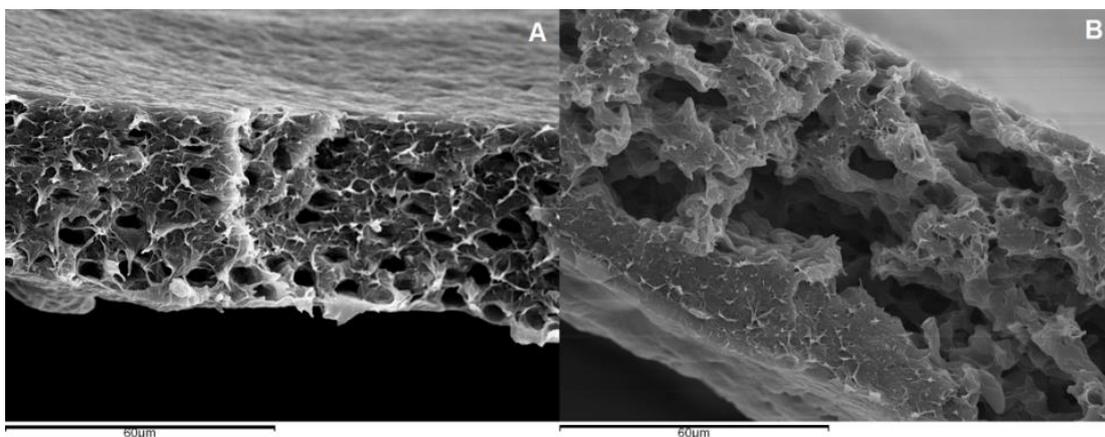


Ilustración 11. (A) Membrana obtenida por precipitación por inmersión. (B) Membrana obtenida por precipitación de la fase vapor. Barra de escala = 60 μm .

Las membranas obtenidas por precipitación por inmersión (Ilustración 11A), poseen una forma de poro pseudoesférica bastante definida y, además, aparecen poros en todo el espesor de la membrana. Ahora bien, cabe decir que se observa mayor concentración de poros en un extremo que en otro, siendo la superficie en contacto con el sustrato donde se disponía la disolución polimérica una capa de polímero macizo, lo que se pensó que podría afectar a la permeabilidad de estas.

En el caso de las membranas obtenidas por precipitación en fase vapor, se aprecia como los poros no tienen una forma definida (Ilustración 11B). Además, la capa maciza de polímero que se forma en una de las superficies es de mayor espesor que en el caso anterior. Esta característica probablemente se deba a que la cinética de intercambio acetona/agua es mucho más lenta cuando el agua está en fase vapor. De esta forma, en la disolución polimérica se produce una estratificación de fases antes de que se produzca el intercambio acetona/agua. Por ello, este método de precipitación fue inmediatamente descartado.

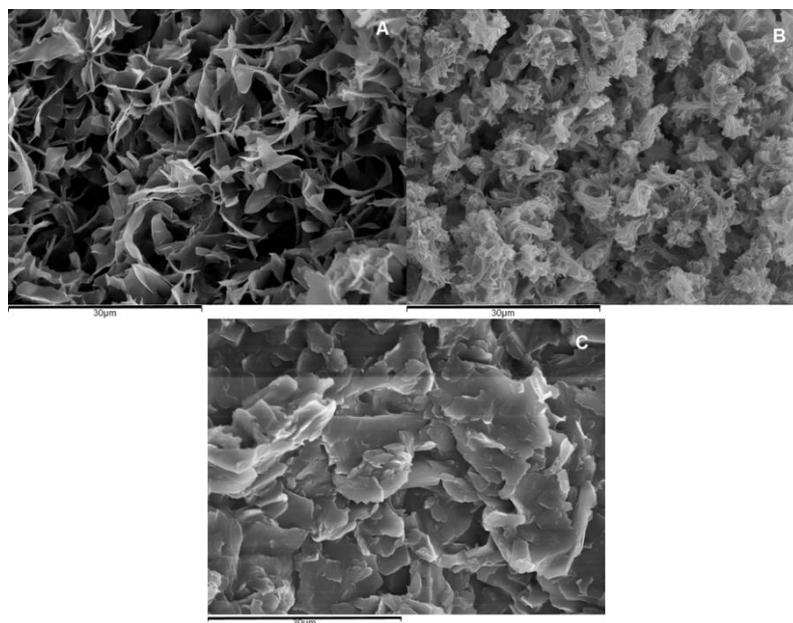


Ilustración 12. (A) Membrana obtenida por congelación de -20 °C a -80 °C y precipitación por inmersión. (B) Membrana obtenida por congelación con N₂ líquido y precipitación por inmersión. (C) Membrana obtenida por precipitación con hidrogeles. Barra de escala = 30 μm

La estructura de las membranas obtenidas por precipitación por congelación de -20 °C a -80 °C por inmersión, difieren bastante de la estructura de las anteriores, ya que con este método los poros se obtienen debidos a la forma de láminas superpuestas que ha tomado el polímero (Ilustración 12A). Además, parece que la porosidad es mayor que en los casos anteriores, al igual que el espesor de la membrana, que alcanza y en algún caso incluso supera los 200 μm. Esto se debe a la congelación de la disolución polimérica previa a la precipitación, que previene cualquier movimiento relativo entre la acetona y el polímero. También se observó que esta estructura era continua en todo el espesor de la membrana. Por todo ello, se consideró un buen método de precipitación a tener en cuenta en el diseño de experimentos.

La estructura de las membranas obtenidas por congelación con N₂ líquido y precipitación por inmersión (Ilustración 12B) es similar a la anterior congelada a -20°C y luego a -80°C. Sin embargo, en este caso,

las láminas de polímero se dividen a su vez en capas. Al igual que el método anterior, éste se considera en el diseño de experimentos.

En el caso de las membranas obtenidas por precipitación con hidrogeles se forma una especie de escamas de polímero (Ilustración 12C). Aunque se observó que esta estructura era continua en todo el espesor de la membrana las imágenes parecían indicar que los poros no estaban interconectados, por lo que esta técnica se descartó para las subsiguientes pruebas.

5.3. Caracterización de las membranas para el diseño de experimentos

En este apartado se muestran los resultados de los ensayos de caracterización realizados a las nueve membranas del diseño de experimentos. Estos resultados muestran los valores de las variables de salida consideradas en el diseño y, a partir de ellos, se determinará la combinación de factores que conduce a unas características óptimas en la membrana. Es decir, el diseño de experimentos nos permite conocer con qué técnica se consigue fabricar una membrana con unas propiedades idóneas para la aplicación que se le va a dar. Las especificaciones de fabricación de cada una de las membranas del diseño de experimentos, son las que se mostraron en la tabla 4.

5.3.1. Caracterización morfológica

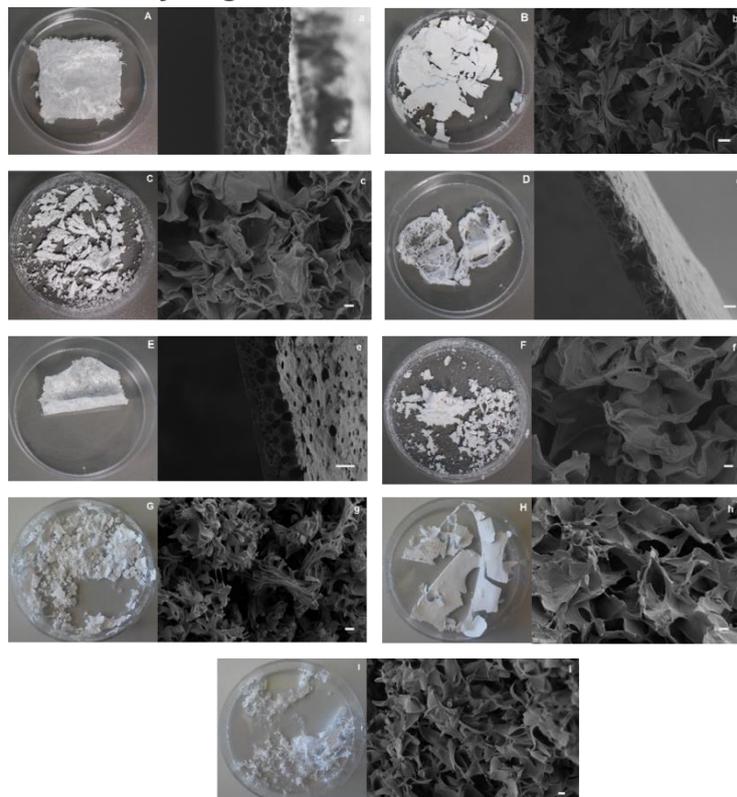


Ilustración 13. Fotografías macroscópicas del aspecto de las membranas (A-I) e imágenes de microscopía electrónica de barrido de la sección transversal de las membranas (a-i). Membranas D1 (A, a), D2 (B, b), D3 (C, c), D4 (D, d), D5 (E, e), D6 (F, f), D7 (G, g), D8 (H, h) y D9 (I, i), siguiendo la nomenclatura de la Tabla 4. Barras de escala: 1 µm (b, c, d, f, g, h, i) y 10 µm (a, e).

A partir de las imágenes tomadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), se observa claramente que la estructura porosa difiere bastante en las membranas previamente congeladas de las que no. Por un lado, en las membranas que no han sido previamente congeladas (Ilustraciones 13a, 13d y 13e) se obtiene una forma de poros definida con baja interconectividad aparente entre ellos. Por otro lado, las membranas que han sido congeladas previamente poseen una elevada porosidad y aunque la estructura porosa es bastante parecida entre membranas, existen diferencias entre la estructura de las membranas que se han obtenido por congelación con N₂ líquido de las que se han congelado de -20 °C a -80 °C debido a la velocidad de congelación que ha sufrido cada una de ellas. Así, se obtuvo una estructura algo más compleja en las membranas fabricadas con previa congelación con N₂ líquido por la formación de cristales más pequeños debido a la elevada velocidad de congelación y, una estructura porosa más sencilla en las otras al tener menor velocidad de congelación y, consecuentemente, cristales de mayor tamaño (Ilustraciones 13b, 13c, 13f, 13g, 13h y 13i).

Además, a partir de las imágenes a tamaño macroscópico (Ilustraciones 13A a 13I) se observa como las membranas que han sido fabricadas con previa congelación tienen mayor tendencia a fracturarse siendo el área máxima obtenida 10 veces menor del área original donde se depositó la disolución, mientras que las membranas que no han sido congeladas se obtienen con la forma original que se le dio a la disolución polimérica. Por tanto, las membranas fabricadas con previa congelación tienen una manipulabilidad aparente menor que las otras, siendo ésta un inconveniente a tener en cuenta tanto a la hora de realizar los ensayos posteriores como a la hora de darle salida al producto. Por ello, se consideró mejorar la manipulabilidad mediante un sellado térmico de la corona exterior de la membrana, en caso de considerarse necesario.

Por otro lado, se aprecian también diferencias en el espesor entre las membranas previamente congeladas y las que no lo han sido. En las membranas fabricadas sin previa congelación el espesor está en torno a 30 µm, esto puede deberse a la elevada cinética del intercambio agua-acetona o, también, porque las corrientes de agua que se generan sobre la disolución polimérica al introducirla en el baño arrastran con ellas parte de la disolución. Las membranas fabricadas con previa congelación de la disolución se obtienen con espesores de hasta 400 µm, lo cual puede deberse a que el intercambio agua-acetona se produce capa por capa conforme se va descongelando la disolución, de esta forma, la estructura que dejará el baño de coagulación es la que poseía la disolución en el momento de la congelación.

Además, no se ha obtenido ninguna membrana translúcida, tal y como se intuía, por la elevada porosidad que poseen.

Por último, aunque se han obtenido membranas parcialmente fragmentadas y especialmente difíciles de caracterizar (Ilustraciones 14C, 14F, 14G y 14I), éstas también forman parte del diseño de experimentos, donde los pares de factores se asocian aleatoriamente, por lo que se pueden dar casos donde el efecto de varios factores sea especialmente negativo para el resultado, pero eso también forma parte del análisis del diseño de experimentos.

5.3.2. Resultados del ensayo de porosidad

Se realizó un ensayo de porosidad a cada una de las membranas obtenidas del diseño de experimentos. La metodología experimental a seguir viene definida en el apartado 4.4.4.1. de este mismo documento, así como las ecuaciones necesarias para obtener los resultados. Dichos resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados del ensayo de porosidad

	Porosidad, π (%)
D1 [RT, 25, 17]	33
D2 [N2, 7, 17]	83
D3 [-80, 7, 13]	90
D4 [RT, 7, 8]	18
D5 [RT, 50, 13]	44
D6 [-80, 25, 8]	90
D7 [N2, 25, 13]	91
D8 [-80, 50, 17]	80
D9 [N2, 50, 8]	84

Analizando los datos de la tabla 7 parece que la porosidad de las membranas precipitadas por inmersión en frío es mucho mayor que la porosidad de las membranas por precipitación por inmersión. Esto se podrá confirmar más adelante cuando se presenten los resultados del diseño de experimentos en cuadrados latinos.

5.3.3. Resultados del ensayo de manipulabilidad

En este apartado se muestran los resultados del ensayo de manipulabilidad como se comentó en el apartado 4.4.4.3. Para los ensayos de manipulabilidad a tracción y a torsión se tuvo en cuenta la opinión de siete investigadores (N=7). En cambio, para la determinación del área máxima solo se consideró la opinión de la persona que fabricó las membranas, ya que anteriormente a este ensayo se realizaron otros ensayos que precisaban de la toma de muestras de cada membrana disgregando así su forma original.

Los datos recogidos en estos tres ensayos se recogen en la tabla 8. En ella aparece la nota promedio entre 1 y 5 de los N investigadores. Además, aparece la misma nota considerando 0 el valor mínimo y 1 el valor máximo.

Tabla 8. Datos promedio tomados del ensayo de manipulabilidad

<i>Manipulabilidad a tracción</i>			<i>Manipulabilidad a torsión</i>			<i>Área máxima</i>		
	Nota	Nota (0-1)		Nota	Nota (0-1)		Nota	Nota (0-1)
D1	3	0.6	D1	5	1	D1	5	1
D2	1	0.2	D2	1	0.2	D2	2	0.4
D3	1	0.2	D3	1	0.2	D3	1	0.2
D4	2	0.4	D4	3	0.6	D4	4	0.8
D5	2	0.4	D5	4	0.8	D5	5	1
D6	1	0.2	D6	1	0.2	D6	1	0.2
D7	2	0.4	D7	2	0.4	D7	2	0.4
D8	2	0.4	D8	2	0.4	D8	3	0.6
D9	2	0.4	D9	2	0.4	D9	1	0.2

A continuación, se muestra en la tabla 9 los resultados de manipulabilidad para cada membrana como la media aritmética de la nota de cada ensayo de manipulabilidad.

Tabla 9. Resultados manipulabilidad

	MEDIA
D1 [RT, 25, 17]	0.88
D2 [N2, 7, 17]	0.27
D3 [-80, 7, 13]	0.21
D4 [RT, 7, 8]	0.63
D5 [RT, 50, 13]	0.73
D6 [-80, 25, 8]	0.21
D7 [N2, 25, 13]	0.45
D8 [-80, 50, 17]	0.51
D9 [N2, 50, 8]	0.30

En vista a los resultados mostrados en la tabla 9, la membrana D1 [RT, 25, 17] posee la mayor manipulabilidad. En cambio, tanto la membrana D3 [-80, 7, 13] como la D6 [-80, 25, 7] son las más frágiles. Además, las tres membranas que poseen una mayor manipulabilidad tienen en común que fueron obtenidas mediante precipitación por inmersión. Por otro lado, las dos membranas con menor manipulabilidad y, por tanto, más frágiles, están precipitadas por inmersión en frío, de -20°C a -80°C. Si bien tanto estas afirmaciones que se pueden hacer al cuantificar la manipulabilidad y porosidad concuerdan con lo expuesto en el punto 5.3.1, para poder obtener conclusiones más amplias de estos resultados, y extrapolar conclusiones de membranas que no fueron producidas, es necesario obtener los resultados completos del diseño de experimentos que se mostrarán más adelante.

5.4. Resultados del diseño de experimentos en cuadrados latinos

Los resultados presentados en el apartado 5.3 se introdujeron en el programa informático “Statgraphics centurión XVI” con tal de obtener los resultados del diseño de experimentos en cuadrados latinos.

➤ Resultados para la variable de salida porosidad

Se expone en la tabla 10 el análisis de la varianza, en el cual se muestra el efecto de la porosidad sobre cada uno de los factores estudiados.

Tabla 10. Análisis de la varianza (ANOVA) para la porosidad (* existen diferencias significativas)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Precipitacion	5963,28	2	2981,64	44,08	0,0222 *
B:Temp_baño	88,1048	2	44,0524	0,65	0,6056
C:Concentración	197,331	2	98,6653	1,46	0,4067
RESIDUOS	135,278	2	67,6389		
TOTAL (CORREGIDO)	6383,99	8			

Los valores-P muestran la significancia estadística de cada factor. De forma que, un valor-P menor que 0.05 determina que dicho factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la porosidad con un 95% de confianza. En este caso, la manera en la que se precipitan las membranas tiene un efecto significativo sobre la porosidad resultante.

A continuación, se muestra el efecto de cada factor sobre la porosidad en forma de gráfico. En los gráficos mostrados se representa el valor medio y los intervalos de confianza del 95% de acuerdo al método de la diferencia significativa honesta (HSD) de Tukey.

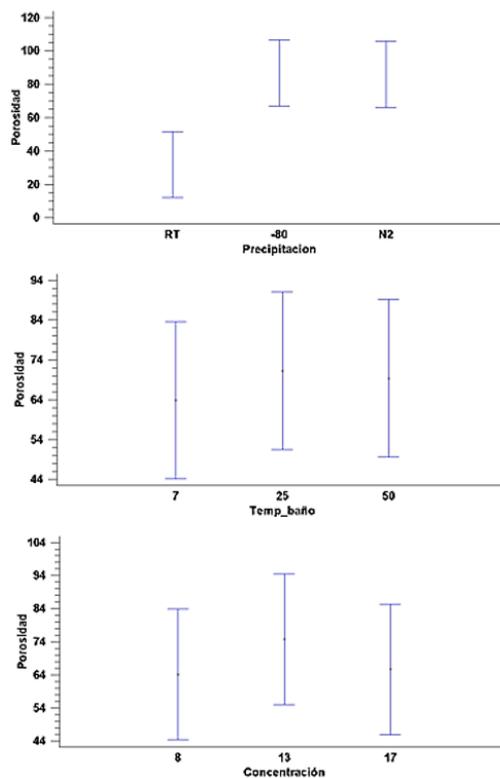


Gráfico 1. Efecto de los factores sobre sobre la porosidad

En el gráfico 1 se observa como las membranas fabricadas por precipitación por inmersión (RT) tienen una porosidad mucho menor que las membranas obtenidas por congelación y precipitación por inmersión (-80 y N2). Obteniéndose una porosidad máxima del 60% en las membranas RT y una porosidad mínima del 70% en las membranas previamente congeladas. Esto puede deberse a que, en las membranas fabricadas por precipitación por inmersión, la cinética del intercambio agua-acetona es mucho más rápida y se produce directamente en todo el espesor, mientras que en las membranas que han sido previamente congeladas, el intercambio agua-acetona se produce más lentamente y capa por capa conforme va descongelándose la disolución al entrar en contacto con el agua que está a mayor temperatura.

Aunque no se obtienen diferencias significativas en la porosidad sobre la temperatura del baño de coagulación, como se ha mostrado en la tabla 11, parece que una temperatura de 25 °C podría favorecer el aumento de la porosidad. Esto puede deberse a que, como la precipitación es un equilibrio entre la difusión del polímero y la acetona en la propia mezcla y la difusión del agua en las inmediaciones de la disolución, no es conveniente que predomine ninguno de los dos efectos sobre el otro (a mayor temperatura del baño favorece el intercambio agua-acetona, aunque también descongela más rápido las capas de las membranas congeladas).

Al igual que en el caso anterior, aunque no se muestra un efecto significativo de la concentración de PCL en la disolución polimérica sobre la porosidad como se ha mostrado en la tabla 11, parece que una concentración del 13% w/w favorece ligeramente el aumento de la porosidad.

➤ Resultados para la variable de salida manipulabilidad

En la tabla 11 se exponen los resultados del análisis de la varianza para la variable de salida manipulabilidad.

Tabla 11. Análisis de la varianza (ANOVA) para la manipulabilidad

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Precipitacion	0,356956	2	0,178478	14,82	0,0632
B:Temp_baño	0,0410889	2	0,0205444	1,71	0,3696
C:Concentración	0,0450889	2	0,0225444	1,87	0,3482
RESIDUOS	0,0240889	2	0,0120444		
TOTAL (CORREGIDO)	0,467222	8			

El valor-P predice que ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de salida manipulabilidad ya que ninguno de ellos es menor de 0.05. Sin embargo, el factor precipitación tiene un valor-P muy próximo a 0.05, por lo que cabe esperar que tenga mayor efecto sobre la manipulabilidad que el resto de factores.

A continuación, se muestra el efecto de cada factor sobre la variable de salida manipulabilidad en forma de gráfico. En los gráficos mostrados se representa el valor medio y los intervalos de confianza del 95% de acuerdo al método de la diferencia significativa honesta (HSD) de Tukey.

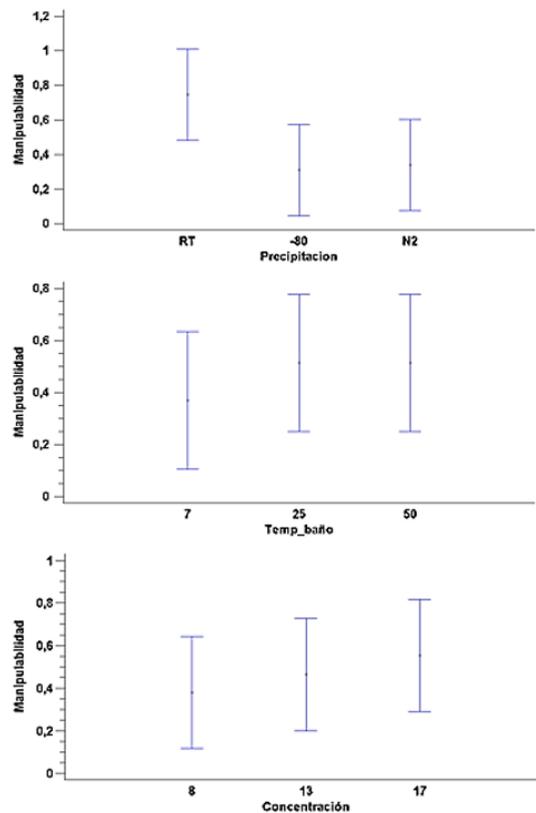


Gráfico 2. Efecto de los factores sobre la manipulabilidad

Como se ha dicho anteriormente, la precipitación de las membranas parece que tiene mayor efecto sobre la manipulabilidad que el resto de factores. Este fenómeno se traduce en que las membranas precipitadas por inmersión (RT), sin previa congelación tienen una mayor manipulabilidad que las membranas previamente congeladas, como se observa en el gráfico 2. Por otro lado, las membranas obtenidas con previa congelación poseen una manipulabilidad menor debido a su elevada porosidad y a su estructura microscópica. Precisamente por esta diferencia tan obvia, se valoró hacer los siguientes análisis no solo con una membrana óptima, sino con la siguiente sub-óptima.

Además, se puede apreciar que no existen diferencias significativas en la temperatura del baño sobre la manipulabilidad. Sin embargo, parece que un aumento en la temperatura produce un leve aumento en la manipulabilidad de las membranas, aunque a partir de 25 °C no es tan destacable.

Aunque el efecto de la concentración de PCL en la disolución polimérica de partida no tiene un efecto significativo sobre la manipulabilidad de las membranas, parece que un aumento de la concentración produce una mayor manipulabilidad, lo cual es coherente ya que a mayor concentración de PCL la estructura posee mayor proporción de polímero, siendo así más estable.

A partir de estos resultados, los factores que proporcionan una membrana con unas propiedades de porosidad y manipulabilidad óptimas se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Niveles de los tres factores que dan lugar a las membranas óptimas

Factor	Óptima	Sub-óptima
Precipitación	N2	RT
Temp_baño	25	25
Concentración	17	17

Además de la membrana óptima que ha dado como resultado el diseño de experimentos, se ha considerado también para su posterior caracterización la membrana fabricada por precipitación por inmersión, con una temperatura del baño de 25 °C y una concentración de la disolución polimérica del 17% w/w (membrana sub-óptima, con dos de los factores optimizados) con tal de determinar las diferencias en el método de fabricación manteniendo constante los otros dos factores. Además, ésta se consideró ya que quizá de la membrana óptima no se podría obtener una membrana de área suficiente como para realizar los subsiguientes ensayos.

5.5. Ensayos de caracterización de las membranas óptimas

Los resultados de los ensayos que se muestran a continuación se realizaron para la membrana óptima y la sub-óptima del diseño de experimentos, éstas son la membrana fabricada a partir de una disolución polimérica al 17% en PCL, congelada con N₂ líquido y precipitada por inmersión en un baño de agua a 25 °C [N₂, 25,17] y la membrana fabricada a partir de una disolución polimérica al 17% en PCL y precipitada por inmersión en un baño de agua a 25 °C [RT, 25,17].

5.5.1. Ensayo de espectrofotometría

En el ensayo de espectrofotometría se realizó, para cada muestra, tres medidas de transmitancia en diferentes zonas de la muestra en función de la longitud de onda (entre 400 y 700 nm, la longitud de onda del espectro visible). Para cada medida en una zona diferente de la muestra se ha realizado la media, resultando entonces tres valores de transmitancia para cada muestra, pudiéndose obtener así la desviación típica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados del ensayo de espectrofotometría

	Transmitancia (%)	Valor máximo transmitancia (%)
RT/25/17 en aire	1.94 ± 0.67	20.1 (400 nm)
RT/25/17 en agua	0.84 ± 0.18	16 (402 nm)
N₂/25/17 en aire	0.22 ± 0.13	14.4 (400 nm)
N₂/25/17 en agua	0.11 ± 0.34	16.6 (400 nm)
Membrana referencia (PC) en aire	69.1 ± 1.64	88.5 (753 nm)

A partir de los resultados mostrados en la tabla 13 se observa que las membranas tienen una transmitancia menor del 2%, siendo mayor la transmitancia en la membrana obtenida por precipitación por inmersión en ambos casos, tanto en aire como en medio acuoso. Además, ambas membranas, tienen mayor transmitancia en aire que en medio acuoso.

Además, el valor máximo de la transmitancia está entre 15 y 20%, encontrándose siempre el valor máximo a longitudes de onda en torno a 400 nm. Cabe decir, que en este caso, también son las membranas fabricadas por precipitación por inmersión las que poseen valores mayores de máximo de transmitancia.

Probablemente, estos valores de transmitancia no serían válidos para trazar células o biosensores mediante microscopía óptica, sin embargo, hay otros factores que son más relevantes que éste como la elevada porosidad y la permeabilidad.

Por otro lado, la membrana de referencia de policarbonato posee una transmitancia mucho mayor que las membranas óptimas, llegando a alcanzar un valor máximo de 88.5% a longitudes de onda entre 700-800 nm.

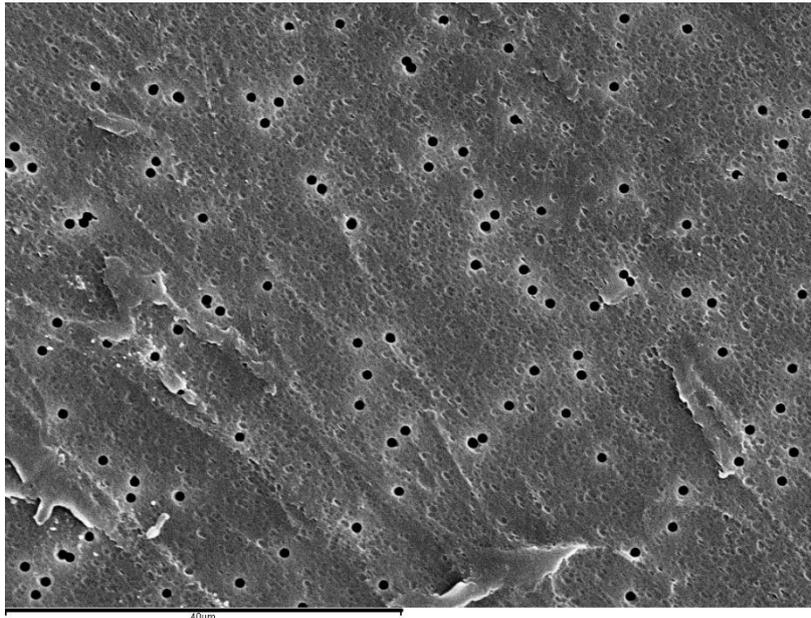


Ilustración 14. Imagen de SEM de la membrana de policarbonato de referencia

La ilustración 14 muestra una imagen tomada mediante SEM de la membrana de policarbonato que se está utilizando actualmente en el proyecto y, la cual se quiere sustituir por una más efectiva. En ésta, se observa que posee una porosidad mucho menor que la de las membranas estudiadas en este trabajo. Precisamente por su baja porosidad, esta membrana posee mayor transmitancia que la que se ha obtenido para las membranas óptimas. Sin embargo, como se ha dicho anteriormente, existen factores más relevantes como la elevada porosidad.

5.5.2. Resultados del ensayo de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los resultados del ensayo de DSC se obtuvieron a partir del software *Pyris Thermal Analysis*, el cual proporciona el gráfico donde se representa el flujo de calor, en mW, frente a la temperatura en °C para cada una de las muestras. Por tanto, permite determinar sobre dicho gráfico la temperatura de transición vítrea (T_g) a partir de la curva del segundo calentamiento (de -80 °C a 120 °C) así como la temperatura de fusión (T_f). Además, permite calcular la entalpía de fusión de cristales a partir del área bajo el pico endotérmico de la curva del primer calentamiento (de 30 °C a 120 °C). A continuación, se muestra en la tabla 14 los resultados obtenidos para cada muestra así como las curvas de calentamiento/enfriamiento.

Tabla 14. Resultados del ensayo de DSC

	T_g (°C)	T_f (°C)	ΔH (J/g)	Cristalinidad (%)
Granza PCL	-61.81	56.57	92.25	66.13
Membrana PCL-N₂	-61.77	57.08	97.28	69.74
Membrana PCL-RT	-61.74	55.41	84.86	60.83

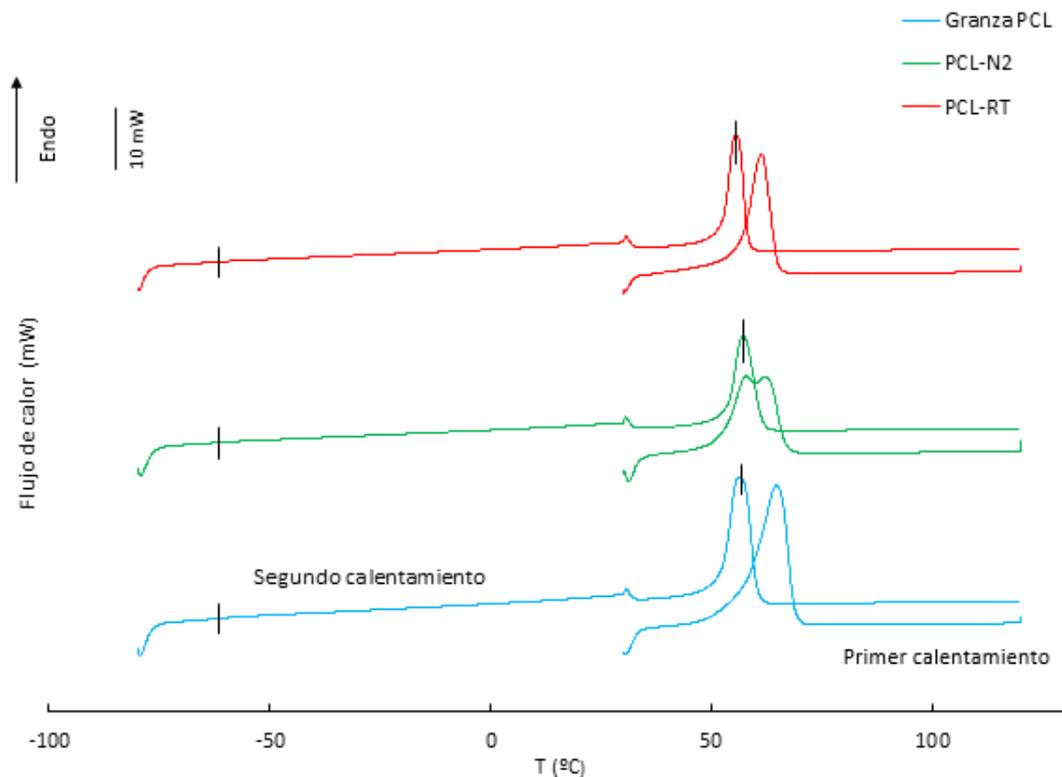


Gráfico 3. Resultados del ensayo de DSC. Representación de flujo de calor frente a temperatura

Se puede observar, tanto en la tabla 14 como en el gráfico 3 que prácticamente no se han producido cambios ni en la temperatura de transición vítrea (T_g) ni en la temperatura de fusión (T_f) de las membranas con respecto a la granza de PCL.

Por otro lado, el grado de cristalinidad, obtenido a partir del dato bibliográfico para una cristalinidad del 100% de $\Delta H_{f100\%} = 139.5 \text{ J/g}$ (Balsamo, Gouveia, Herrera, Laredo, & Méndez, 2006), es muy similar, tanto en las membranas congeladas con N_2 líquido como en las membranas fabricadas por precipitación por inmersión con respecto a la granza de PCL. Un enfriamiento rápido a partir de un polímero que no tiene cristales (disuelto o fundido) debería producir cristales muy pequeños y consecuentemente poco abundantes, lo que sin embargo, no ocurre. Probablemente sea porque, en este caso, el disolvente (acetona) favorece la movilidad de las cadenas del polímero (PCL), incluso en enfriamientos muy rápidos como el caso del enfriamiento con N_2 líquido.

Además, la elevada cristalinidad obtenida provoca que el polímero sea opaco por las diferentes fases (cristalina y amorfa) de que está constituida la masa de polímero, siendo éste otro factor que dificulta que las membranas tengan mayor transmitancia y sean translúcidas.

5.5.3. Resultados del ensayo de termogravimetría (TGA)

Los datos obtenidos a partir del ensayo de TGA se muestran en el gráfico 8, donde se representa la pérdida de masa (W) en función de la temperatura (T) para cada una de las muestras.

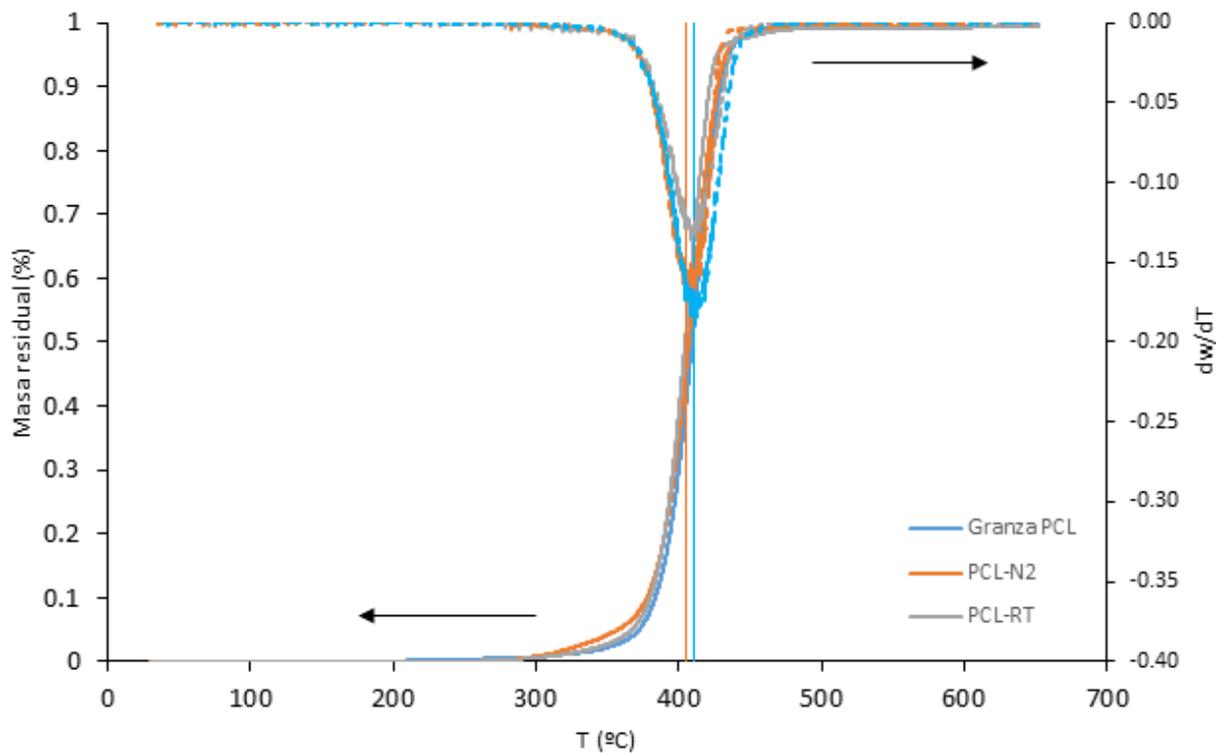


Gráfico 4. Datos obtenidos del ensayo de TGA. Las líneas punteadas representan la derivada de la masa residual respecto a la temperatura.

Del gráfico 4 se obtiene la temperatura de degradación (T_d) de cada una de las muestras a partir del punto medio del salto que se produce en la gráfica debido a la pérdida de masa. Además, también se puede obtener del punto mínimo de la representación de la derivada de la masa residual respecto a la temperatura.

Los resultados obtenidos del gráfico 4, se presentan en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados del ensayo de TGA

	T_d (°C)
Granza PCL	412
Membrana [N ₂ , 25, 17]	410
Membrana [RT, 25, 17]	408

Como se puede observar en la tabla 18 el valor de la temperatura de degradación no ha variado prácticamente en ninguna de las membranas con respecto a la granza de PCL. Por lo tanto, el proceso

de fabricación de membranas no ha modificado químicamente el polímero y, además, la matriz polimérica parece tener propiedades muy similares al polímero original (Granza de PCL). Además, la temperatura de degradación es mucho mayor que la requerida para el sellado y, por tanto, las membranas podrán utilizarse para el fin previsto.

5.5.4. Resultados del ensayo de permeabilidad

A continuación, se muestran los resultados del ensayo de permeabilidad para la membrana fabricada por precipitación por inmersión.

Tabla 15. Geometría de las muestras

	Diámetro D (mm)	Área A (mm²)	Espesor L (mm)
Medida 1 (PCL-RT)	9.70	73.9	0.10
Medida 2 (PCL-RT)	9.75	74.7	0.13
Medida 3 (PCL-RT)	9.80	75.4	0.13
Media (PCL-RT)	9.75	74.7	-
Medida 1 (PC)	10	78.54	0.01
Medida 2 (PC)	10	78.54	0.01
Medida 3 (PC)	10	78.54	0.01
Media (PC)	10	78.54	-

En la tabla 15 se muestran tres medidas del área de las muestras de las membranas fabricadas por precipitación por inmersión (PCL-RT) y tres medidas del área de las muestras de las membranas de policarbonato de referencia (PC). Además, se muestra la media de estas tres medidas para cada membrana, que es la que se utilizó para realizar los cálculos, puesto que la sección transversal interna de la tubería no varía. También se muestra el espesor de cada muestra (L) y, en este caso, no se realiza la media ya que se utiliza para cada muestra el valor de su espesor real.

Tabla 16. Datos experimentales de las muestras

	m_{vaso} (g)	m_{vaso+H2O} (g)	Δt (s)	Δp (bar)
RT1	54.553	54.553 ± 0.05	60	0.11
RT2	53.077	54.710 ± 0.25	60	0.14
RT3	53.077	53.663 ± 0.94	60	0.16
PC1	53.077	54.121 ± 0.13	60	0.13
PC2	53.077	53.308 ± 0.03	60	0.12
PC3	53.077	53.729 ± 0.03	60	0.12

En la tabla 16 se muestran los datos que se tomaron en el laboratorio para el ensayo de permeabilidad de tres muestras de membranas fabricadas por precipitación por inmersión y tres muestras de la membrana de policarbonato de referencia.

Tabla 17. Resultados del ensayo de permeabilidad

	V ($\times 10^{-6}$ m ³)	CWP ($\times 10^{-9}$ m ² ·s/kg)	k ($\times 10^{-17}$ m ²)	Q ($\times 10^{-8}$ m ³ /s)	Q (l/h)
RT1	1.48 ± 0.05	30.0 ± 1.00	-267.0 ± 9.00	2.47 ± 0.08	0.089 ± 0.080
RT2	1.64 ± 0.25	25.6 ± 4.30	-296.0 ± 50.00	2.73 ± 0.42	0.098 ± 0.420
RT3	0.59 ± 0.09	8.2 ± 1.30	-95.0 ± 15.00	0.98 ± 0.16	0.035 ± 0.160
Media	1.24 ± 0.46	21.3 ± 9.40	-219.0 ± 89.00	2.06 ± 0.77	0.074 ± 0.030
PC1	1.05 ± 0.12	1.2 ± 0.10	-1.0 ± 0.14.00	1.75 ± 0.20	0.063 ± 0.007
PC2	0.23 ± 0.03	0.3 ± 0.04	-0.3 ± 0.04	0.39 ± 0.05	0.014 ± 0.002
PC3	0.65 ± 0.03	0.9 ± 0.04	-0.8 ± 0.04	1.09 ± 0.05	0.039 ± 0.002
Media	0.64 ± 0.33	0.8 ± 0.40	-0.7 ± 0.29	1.08 ± 0.55	0.039 ± 0.020

A partir de los resultados obtenidos del ensayo de permeabilidad (tabla 17), se puede afirmar que la permeabilidad intrínseca (k) de las membranas diseñadas en este trabajo es mucho mayor que la de las membranas de policarbonato de referencia que se estaban utilizando hasta ahora. Por tanto, el caudal de fluido que deja pasar la membrana fabricada por precipitación por inmersión también es mayor que la de referencia, debido a que ésta tiene mayor porosidad como se puede apreciar en las imágenes tomadas en microscopía.

Como ya se ha comentado en la parte de resultados del diseño de experimentos del punto 5.4, para las membranas fabricadas por congelación con N₂ líquido y precipitación por inmersión no se han podido obtener resultados debido a que al introducir la disolución congelada en el baño de coagulación ésta se fractura. De entre los fragmentos obtenidos, el que mayor área posee es de 19.63 mm², siendo necesario un área mínima de 254.47 mm². Aunque no se pudo obtener un fragmento de membrana sin microfracturas suficientemente grande, se pudo evitar el problema de que estas membranas fueran muy frágiles fundiendo una corona exterior para poder acoplarla al sistema de juntas que utiliza el ensayo de permeabilidad.

5.5.5. Resultados del ensayo de hinchado en medio salino

Los resultados del ensayo de hinchado en medio salino se representan en forma de gráfico de dispersión (Gráfico 5) donde se representa el contenido de agua en equilibrio (EWC) en función del tiempo.

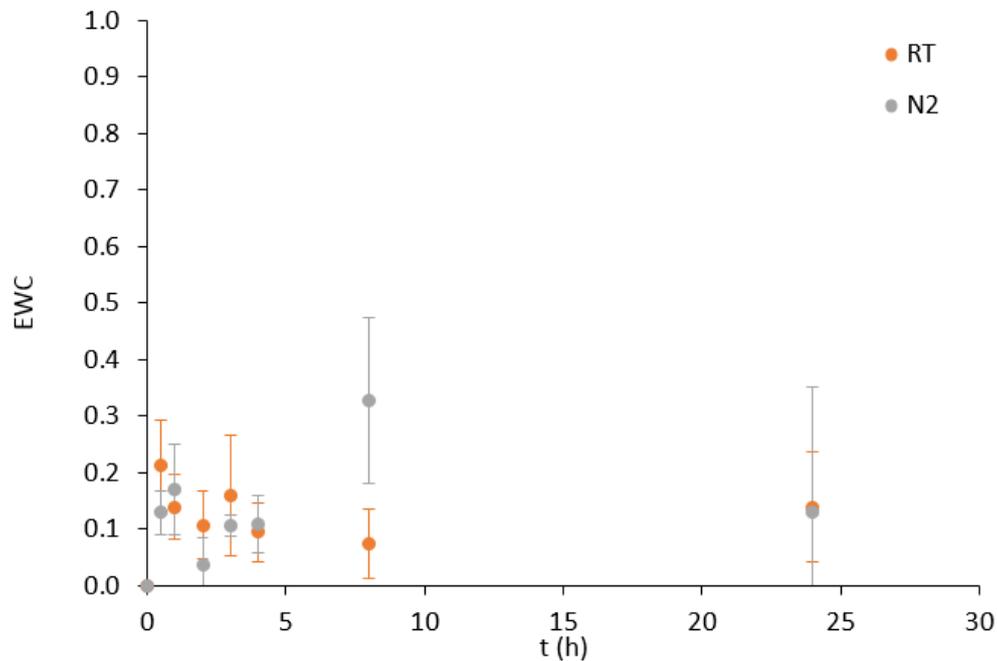


Gráfico 5. Resultados del ensayo de hinchado

Como se puede observar en el gráfico 5, los valores del contenido de agua en equilibrio (EWC) toman valores bajos para ambas membranas. Además, se mantienen prácticamente constantes con el tiempo. Por tanto, parece que el polímero no absorbe agua en su matriz (esto es razonable, pues la PCL es bastante hidrófoba por las largas cadenas de grupos $-CH_2$). Cabe decir, que se presenta algún valor máximo en torno a 30-35% que se puede deber a la adsorción de agua a la superficie del polímero y no a la absorción, además, ya que las membranas son muy porosas y muestran al entorno una gran cantidad de superficie, por lo que es difícil eliminar por completo el agua adsorbida pudiendo dar valores significativos debido a ésta.

6. CONCLUSIONES

La principal conclusión del presente Trabajo Fin de Grado es que se ha logrado el propósito de fabricar membranas poliméricas microporosas como parte de un sistema membrana/*scaffold* que sirva como soporte que actúe de barrera al tránsito celular para un dispositivo de cocultivo microfluídico.

La técnica de fabricación de membranas de inversión de fase y pequeñas adaptaciones de esta ha permitido obtener dichos soportes, y gracias a un cribado en las variables que podían afectar al proceso mediante un diseño de experimentos, se han podido obtener los parámetros óptimos de operación. La membrana cuyas características son más deseables es aquella que se obtiene congelando la disolución de policaprolactona al 17% con nitrógeno líquido, antes de precipitarla con agua en un baño a 25 °C, si bien es cierto que el mismo procedimiento sin congelar la disolución ofrece prestaciones complementarias que también pueden ser de interés, dependiendo del uso específico.

Así, se han logrado obtener membranas poliméricas que poseen la mayoría de características necesarias para la aplicación requerida, a saber:

- Biocompatible, las membranas han sido fabricadas de policaprolactona (PCL) que es un material no tóxico y biocompatible.
- Porosidad pasante, se ha comprobado mediante ensayos de caracterización en FESEM que las membranas fabricadas por congelación y precipitación por inmersión tienen una porosidad interconectada que hace que los poros sean pasantes. También, cabe decir que el tamaño de poro de todas ellas está entre un rango de 5-10 μm que hace que sean capaces de separar poblaciones celulares.
- Que hinche poco (o nada) en medio acuoso, se ha determinado mediante ensayos de hinchado en medio salino que las membranas obtenidas tienen un valor muy bajo de contenido de agua en equilibrio (EWC), pues están fabricadas a partir de un polímero bastante hidrófobo.
- Que no degrade a la temperatura de sellado, se ha comprobado mediante ensayos de TGA, que la temperatura de degradación está en torno a 400 °C permitiendo así sellar la membrana al *scaffold* aplicando la temperatura requerida.
- Que sea permeable químicamente pero impermeable a las células, se ha determinado mediante ensayos de permeabilidad que las membranas fabricadas por precipitación por inmersión (sin previa congelación) son más favorables en este sentido que la membrana que se está utilizando actualmente como referencia.

Además, se ha comprobado mediante ensayos de caracterización que las membranas fabricadas por precipitación por inmersión (sin previa congelación) son, en general, más favorables que la membrana de policarbonato de referencia utilizada actualmente. Por otro lado, las membranas fabricadas por previa congelación con N_2 líquido y precipitación por inmersión ha resultado ser desfavorable en cuanto a su manipulabilidad con respecto a la membrana de referencia.

Sin embargo, no se ha logrado que dichas membranas sean transparentes o translúcidas ya que tal y como se observó en el ensayo de espectrofotometría la transmitancia de las membranas posee un valor muy bajo, no logrando alcanzar el 10% de valor promedio en ninguna de ellas, por lo que a día de hoy no se puede analizar y trazar las células mediante microscopía óptica con el uso de estas membranas. Además, cabe decir que, a pesar de que las membranas previamente congeladas con N_2

líquido poseen una estructura porosa más interesante por su interconectividad y cantidad de poros que la obtenida en las membranas sin congelar, se fracturan muy fácilmente a partir de la precipitación en el baño de coagulación. A pesar de esto, cabe decir que se consiguió sellar estas membranas aumentando la temperatura hasta la fusión del material en los bordes de éstas, consiguiendo así disminuir la probabilidad de fractura si se manipula por la zona sellada.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En futuros estudios sobre fabricación de membranas para su uso como soporte de cocultivo celular indirecto, sería interesante, sobre todo, aumentar la transmitancia a la luz visible en medio acuoso. Para ello, un posible ensayo sería someter a las membranas, una vez fabricadas, a un tratamiento con plasma de oxígeno. Variando diferentes condiciones de ensayo y, midiendo posteriormente la transmitancia de las membranas tratadas en medio acuoso con tal de verificar si se ha producido una mejora o no en la absorción de la luz visible. El plasma de oxígeno podría activar los grupos laterales de las macromoléculas de policaprolactona, aumentando así la compatibilidad de las cadenas con el agua circundante. Este procedimiento debería ofrecer buenos resultados ya que, como se puede observar en la ilustración 15, ya se han realizado pruebas sobre sustratos de características muy similares.

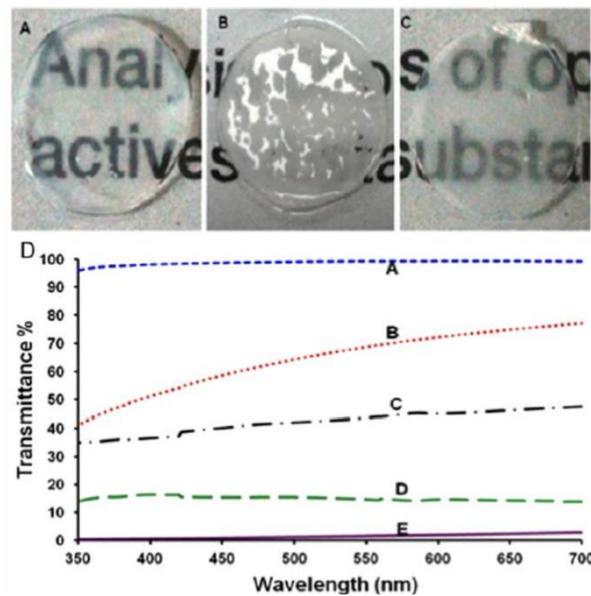


Ilustración 15. Ejemplo de membranas de PCL obtenidas mediante *electrospinning* tratadas con plasma de O_2 a diferentes condiciones de operación (Sharma, Gupta, Mohanty, Jassal, & Agrawal, 2016)

Posteriormente, sería necesario realizar un ensayo de caracterización microscópica para determinar si se ha modificado la estructura porosa del material después del tratamiento con plasma de oxígeno, ya que es posible que una mejora en la transmitancia a la luz visible se deba a un colapso de los poros, dejando así al material inutilizado para la aplicación que se le quiere dar. Otra posibilidad para mejorar las propiedades ópticas sería, quizá, disminuir la cristalinidad del polímero.

Más allá del estudio que se ha realizado sobre el equilibrio tricomponente de la policaprolactona, se podrían estudiar distintos solventes y no-solventes de ésta, que tuviesen diferente afinidad entre ellos y se pudiese modular, así, la cinética de transferencia de masa durante el proceso de inversión de fase.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Registro Español de Enfermos Renales (REER). (2014). [Citado 2017 febrero 9] Disponible de: <http://www.registrenal.es/index.php>
- [2] Colbert, B. J., Ankney J. & Lee, K. T., (2009), *Anatomy, Physiology, & disease: an interactive journey for health professions*, Mishawaka, EEUU: Pearson educación.
- [3] Giménez, N., Pedrazas, D., Redondo, S. y Quintana S. Ensayos clínicos y consentimiento informado: visión de investigadores, pacientes y médicos de familia. *Atención Primaria*, 48 (8), 518 – 526.
- [4] Marieb, E. N., (2008), *Anatomía y fisiología humana*, Madrid, España: Pearson educación.
- [5] Padial, J. (2016). ¿Qué es el túbulo contorneado proximal? *Curiosoando*. [Citado 2017 febrero 12] <https://curiosoando.com/que-es-el-tubulo-contorneado-proximal>.
- [6] Cho, S.-H., Noh, J.-R., Cho, M. Y., Go, M.-J., Kim, Y.-H., Kang, E. S., ... Lim, Y. T. (2017). An injectable collagen/poly(γ -glutamic acid) hydrogel as a scaffold of stem cells and α -lipoic acid for enhanced protection against renal dysfunction. *Biomater. Sci.*, 5 (2) 285–294.
- [7] Thakkar, U. G., Vanikar, A. V., & Trivedi, H. L. (2017). Stem cell therapy: An emerging modality in glomerular diseases. *Cytotherapy*, 19(3), 333–348.
- [8] Lin, C.-S. (2010). Advances in stem cell therapy for the lower urinary tract. *World Journal of Stem Cells*, 2(1), 1–4.
- [9] Layton, A. T. (2013). Mathematical modeling of kidney transport. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 5(5), 557–573.
- [10] Hunt, A., Ristolainen, A., Ross, P., Öpik, R., Krumme, A., & Kruusmaa, M. (2013). Low cost anatomically realistic renal biopsy phantoms for interventional radiology trainees. *European Journal of Radiology*, 82(4), 594–600.
- [11] Wilmer, M. J., Ng, C. P., Lanz, H. L., Vulto, P., Suter-Dick, L., & Masereeuw, R. (2016). Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening. *Trends in Biotechnology*.
- [12] Tarn, M. D., & Pamme, N. (2014). Microfluidics. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 1–7.
- [13] Chen, P., Feng, X., Du, W., & Liu, B.-F. (2008). Microfluidic chips for cell sorting. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13, 2464–2483.
- [14] Baret, J.-C., Miller, O. J., Taly, V., Ryckelynck, M., El-Harrak, A., Frenz, L., ... Griffiths, A. D. (2009). Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab on a Chip*, 9(13), 1850–8.
- [15] Drake, R. M., & Gordon, J. E. (1985). Mie scattering. *American Journal of Physics*, 53(10), 955–962.
- [16] Saidi, I. S., Jacques, S. L., & Tittel, F. K. (1995). Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin. *Applied Optics*, 34(31), 7410–7418.
- [17] Sackmann, E. K., Fulton, A. L., & Beebe, D. J. (2014). The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491), 181–9.

- [18] Jang, K.-J., Mehr, A. P., Hamilton, G. a, McPartlin, L. a, Chung, S., Suh, K.-Y., & Ingber, D. E. (2013). Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 5(9), 1119–29.
- [19] Urrios, A., Parra-Cabrera, C., Bhattacharjee, N., Gonzalez-Suarez, A. M., Rigat-Brugarolas, L. G., Nallapatti, U., ... Zhang, X. (2016). 3D-printing of transparent bio-microfluidic devices in PEG-DA. *Lab Chip*, 16(12), 2287–2294.
- [20] Drosdoff, D., & Widom, A. (2005). Snell's law from an elementary particle viewpoint. *American Journal of Physics*, 73(10), 973
- [21] Penttilä, A. & Lumme, K. (2009). The effect of the properties of porous media on light scattering. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 110, 1993-2001.
- [22] Charcosset, C. (2012). Ultrafiltration. In *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceutics* (pp. 43-99).
- [23] American Membrane Technology Association (AMTA). (2007). Application of Membrane Technologies. *Membranes*.
- [24] Claussen, I. C., Ustad, T. S., Strømme, I., & Walde, P. M. (2007). Atmospheric Freeze Drying— A Review. *Drying Technology*, 25(6), 947–957.
- [25] Wang, L., & Ryan, A. J. (2011). Introduction to electrospinning. *Electrospinning for Tissue Regeneration*, 3–33.
- [26] Soyekwo, F., Zhang, Q. G., Deng, C., Gong, Y., Zhu, A. M., & Liu, Q. L. (2014). Highly permeable cellulose acetate nanofibrous composite membranes by freeze-extraction. *Journal of Membrane Science*, 454, 339–345.
- [27] I.M. Wienk, R.M Boom, M.A.M. Beerlage, A.M.W. Bulte, C.A. Smolders & H. Strathmann. (1995). Recent advances in the formation of phase inversion membranes made from amorphous or semi-crystalline polymers.
- [28] Soh, Y. S., Kim, J. H., & Gryte, C. C. (1995). Phase behaviour of polymer/solvent/ non-solvent systems. *Polymer*, 36(19), 3711–3717.
- [29] Liu, M., Xu, Z., Chen, D., & Wei, Y. (2010). Preparation and characterization of microporous PVDF membrane by thermally induced phase separation from a ternary polymer/solvent/non-solvent system. *Desalination and Water Treatment*, 17(1–3), 183–192.
- [30] Stevanovic, M., Ignjatovic, N., Jordovic, B., & Uskokovic, D. (2007). Stereological analysis of the poly-(DL-lactide-co-glycolide) submicron sphere prepared by solvent/non-solvent chemical methods and centrifugal processing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(7), 1339–1344.
- [31] Yalcinkaya, F. (2015). Experimental study on electrospun polyvinyl butyral nanofibers using a non-solvent system. *Fibers and Polymers*, 16(12), 2544–2551. [Citado 2017 abril 6]
- [32] He, L., Zhang, Y., Zeng, X., Quan, D., Liao, S., Zeng, Y., ... Ramakrishna, S. (2009). Fabrication and characterization of poly(l-lactic acid) 3D nanofibrous scaffolds with controlled architecture by liquid-liquid phase separation from a ternary polymer-solvent system. *Polymer*, 50(16), 4128–4138.

- [33] Rajabzadeh, S., Maruyama, T., Sotani, T., & Matsuyama, H. (2008). Preparation of PVDF hollow Fiber membrane from a ternary polymer/solvent/nonsolvent system via thermally induced phase Separation (TIPS) method. *Separation and Purification Technology*, 63(2), 415–423.
- [34] Zhang, J., Zhang, Y., & Zhao, J. (2011). Thermodynamic study of non-solvent/dimethyl sulfoxide/polyacrylonitrile ternary systems: Effects of the non-solvent species. *Polymer Bulletin*, 67(6), 1073-1089.
- [35] Matsuyama, H., Tachibana, M., Maki, T., & Teramoto, M. (2002). Light-scattering study on porous membrane formation by dry-cast process. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(13), 3205-3209.
- [36] Vankelecom, I. F. J.; De Smet, K.; Gevers, L. E. M.; Jacobs, P. A. In *Nanofiltration: Principles and Applications*; Schäfer, A. I., Fane, A. G., Waite, T. D., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2005; Chapter 3, pp 33-65.
- [37] Leeuwenburgh, S. C. G., Jansen, J. A., Malda, J., Dhert, W. A., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. A., ... Williams, D. F. (2008). Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress 2008. *Biomaterials*, 29(21), 3047–3052.
- [38] Saito, A. (2014). Kidney tissue engineering. *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*, 414–438.
- [39] Pielichowska, K., & Blazewicz, S. (2010). *Biopolymers. Advances in Polymer Science*, 232.
- [40] Ginebra, M., Gil, F., & Planell, J. (2002). *Biomateriales*, 141–157.
- [41] Bose, S., & Bandyopadhyay, A. (2013). Introduction to Biomaterials. Characterization of Biomaterials. *Elsevier*, 1-9.
- [42] Labet, M., & Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38(12), 3484.
- [43] Kim, S., & Takayama, S. (2015). Organ-on-a-chip and the kidney. *Kidney Research and Clinical Practice*, 34(3), 165–169.
- [44] Brandrup, J., (1975), *Polymer handbook*, Mishawaka, IN, EEUU: John Wiley & Sons.
- [45] Balsamo, V., Gouveia, L. M., Herrera, L., Laredo, E., & Méndez, B. (2006). MISCIBILIDAD EN MEZCLAS DE POLI (ESTIRENO- co -ANHÍDRIDO MALEICO) Y POLI (ε -CAPROLACTONA) (SMA / PCL), 24(1), 17–30.
- [46] Sharma, S., Gupta, D., Mohanty, S., Jassal, M., & Agrawal, A. K. (2016). Scaffold With Improved Optical Transparency and Bioactivity for Damaged Ocular Surface Reconstruction, 899–907.

PRESUPUESTO

JUSTIFICACIÓN DEL PRESUPUESTO

El estudio económico que se detalla a continuación consta de los gastos generados de material y maquinaria en los laboratorios donde se realizaron los ensayos de investigación, así como los gastos atribuidos al diseño de los experimentos realizados, resolución de problemas que se fueron generando en forma de costes generales y puesta en marcha del propio trabajo.

El objetivo de dicho estudio económico es la realización de un presupuesto que se descompondrá en varios presupuestos parciales donde se especificarán los precios unitarios y descompuestos, así como las mediciones. Con esto, se pretende verificar la factibilidad y viabilidad económica además de los impactos atribuidos al desarrollo del producto.

El presupuesto de ejecución material está constituido por los costes del material, maquinaria y mano de obra generados en los procesos realizados en el laboratorio. A esto se le suman unos gastos auxiliares a cada una de las actividades realizadas.

A continuación se detallan los cuadros presupuestarios que se generarán posteriormente:

- **Cuadro de precios de recursos por clase**, donde se clasifican los gastos por recurso utilizado según sea material, maquinaria, mano de obra o medios auxiliares.
- **Cuadro de mediciones y presupuesto**, en él se especifican los precios y mediciones de cada recurso considerado en cada partida, de forma que cada capítulo quede descompuesto.
- **Cuadro de presupuesto resumido**, donde se obtiene un resumen del cuadro de mediciones y presupuesto, obteniéndose así el precio de cada partida, el precio de cada capítulo a partir de la suma del precio de cada una de las partidas de las que se compone y el presupuesto de ejecución material a partir de la suma del precio de cada capítulo.
- **Cuadro de resumen de capítulos**, en él se obtiene el coste de cada capítulo, el presupuesto de ejecución material, el presupuesto por contrata y el presupuesto total.

Para la elaboración del presupuesto se ha considerado para la maquinaria el precio suministrado por cada fabricante, teniendo en cuenta la amortización, donde la vida útil se ha considerado de 5 o 10 años dependiendo del tipo de maquinaria. El precio de las sustancias y material de laboratorio se ha obtenido de la casa comercial que suele ser la suministradora de éstos en los laboratorios del CBIT. Además, al presupuesto total se le aplica un 13% de gastos generales, un 6% de beneficio industrial y un 21% de IVA.

	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 1
	CUADRO DE PRECIOS DE RECURSOS POR CLASE	Ref.: procdp1c
		Fec.:

Código	Descripción del recurso	Precio
1	Mano de Obra	
00001	h Director de proyecto	13,14
00002	h Codirector de proyecto	10,37
31271035	h Técnico de laboratorio en química industrial	8,53
2	Maquinaria	
00001	u Baño ultrasonidos	32,72
00002	h Válvula de bola	0,01
00003	h Calorímetro	0,95
00004	h FESEM	25,00
00005	h Pipeta automática	0,03
073-006531	u Desecador de vacío	0,26
09020-0275	h Estufa climática	1,17
4101	h Espectrofotómetro	0,05
459407	u Bomba de agua	23,99
6106359	h Congelador	0,01
BAT300	h Balanza de precisión	0,20
CL3512A	h Termopar	0,12
DMH50E	h Agitador	0,14
PGM	h Manómetro	0,07
TarifaA	h SEM	13,00
UFV500	h Ultracongelador	0,16
3	Material	
00001	u Placa de vidrio	15,50
00002	u Placa de teflón	20,00
00003	u Mechero Bunsen	25,14
00004	cm2 Placa de latón	0,52
00005	h Termogravímetro	2,27
00006	u Recipiente de metacrilato	34,95
00007	cm2 Hoja de teflón	0,01
00008	u Troquel	0,20
00009	l N2 líquido	7,50
00010	kg NaCl	12,71
00011	u Placa de cultivo	8,93
073-710250	u Frasco de vidrio	17,52
11952	u Pinza abatible	0,23
12167	kg Alginato de sodio	48,90
12294	kg Cloruro cálcico	3,45
19561-1	kg Policaprolactona	322,14
23-700	u Guantes térmicos	13,99
2890	u Gafas de seguridad	12,00
3090286	u Jeringuilla	0,16
3920000BOC	u Cuchara sólidos	37,29
636-A	u Caja poliestireno expandido	12,60
AC03191000	l Acetona	83,01
BMS13665	u Placa Petri	0,50
BS1387	m Tubería	11,85
C5670	kg Cloruro cálcico	732,00
DLB001	u Pipeta Pasteur	0,06
EKP50	u Portaobjetos	0,16
HV78	u Martillo	3,56
IF21	u Rasqueta	1,20
MBL013	u Tetina de goma	0,01
RR94320	u Vial	0,98
RR94350	u Vaso de precipitados	9,09

	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 2
	CUADRO DE PRECIOS DE RECURSOS POR CLASE	Ref.: procdp1c
		Fec.:

Código	Descripción del recurso	Precio
RR95915		
RR99613	u Agitador magnético	1,91
YDS-2	u Dewar	110,45

	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 1
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	Ref.: promyp1
	Estudio del equilibrio multicomponente	Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
01	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo								
	Estudio del equilibrio multicomponente								
	Toma de datos experimentales								
	01.01 01.01								
		1				1,00			
	Total partida 01.01						1,00	79,69	79,69
	Total capítulo 01								79,69

	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 2
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	Ref.: promyp1
	Fabricación de membranas	Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
02	Fabricación de membranas								
02.01 02.01	Disoluciones poliméricas								
	Total partida 02.01	1				1,00	1,00	168,87	168,87
02.02 02.02	Congelación de las disoluciones poliméricas								
	Total partida 02.02	1				1,00	1,00	320,83	320,83
02.03 02.03	Precipitación de las membranas								
	Total partida 02.03	1				1,00	1,00	163,48	163,48
	Total capítulo 02								653,18

	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 3
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	Ref.: promyp1
	Caracterización	Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
03	Caracterización								
03.01 03.01	Caracterización en SEM								
	Total partida 03.01	1				1,00	1,00	69,34	69,34
03.02 03.02	Caracterización en FESEM								
	Total partida 03.02	1				1,00	1,00	150,85	150,85
03.03 03.03	Ensayo de porosidad								
	Total partida 03.03	1				1,00	1,00	52,14	52,14
03.04 03.04	Ensayo de manipulabilidad								
	Total partida 03.04	1				1,00	1,00	25,59	25,59
03.05 03.05	Ensayo de espectrofotometría								
	Total partida 03.05	1				1,00	1,00	64,50	64,50
03.06 03.06	Caracterización en DSC								
	Total partida 03.06	1				1,00	1,00	68,39	68,39
03.07 03.07	Ensayo de permeabilidad								
	Total partida 03.07	1				1,00	1,00	86,22	86,22
03.08 03.08	Caracterización en TGA								
	Total partida 03.08	1				1,00	1,00	84,28	84,28
03.09 03.09	Ensayo de hinchado								
	Total partida 03.09	1				1,00	1,00	26,54	26,54
	Total capítulo 03								627,85

	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 4
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	Ref.: promyp1
	Dirección de trabajo	Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
04	Dirección de trabajo								
04.01 04.01	Reuniones								
	Total partida 04.01	1				1,00	1,00	518,00	518,00
04.02 04.02	Redacción informe								
	Total partida 04.02	1				1,00	1,00	767,70	767,70
	Total capítulo 04								1.285,70
	Total presupuesto								2.646,42

Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 1
PRESUPUESTO RESUMIDO	Ref.: propre2
Estudio del equilibrio multicomponente	Fec.:

N.º Orden	Descripción de las unidades de obra	Medición	Precio	Importe
	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo			
01	Estudio del equilibrio multicomponente			
01.01	Toma de datos experimentales	1,00	79,69	79,69
	Total Capítulo 01			79,69
02	Fabricación de membranas			
02.01	Disoluciones poliméricas	1,00	168,87	168,87
02.02	Congelación de las disoluciones poliméricas	1,00	320,83	320,83
02.03	Precipitación de las membranas	1,00	163,48	163,48
	Total Capítulo 02			653,18
03	Caracterización			
03.01	Caracterización en SEM	1,00	69,34	69,34
03.02	Caracterización en FESEM	1,00	150,85	150,85
03.03	Ensayo de porosidad	1,00	52,14	52,14
03.04	Ensayo de manipulabilidad	1,00	25,59	25,59
03.05	Ensayo de espectrofotometría	1,00	64,50	64,50
03.06	Caracterización en DSC	1,00	68,39	68,39
03.07	Ensayo de permeabilidad	1,00	86,22	86,22
03.08	Caracterización en TGA	1,00	84,28	84,28
03.09	Ensayo de hinchado	1,00	26,54	26,54
	Total Capítulo 03			627,85
04	Dirección de trabajo			
04.01	Reuniones	1,00	518,00	518,00
04.02	Redacción informe	1,00	767,70	767,70
	Total Capítulo 04			1.285,70
	Total Presupuesto			2.646,42

	Desarrollo de membranas poliméricas microporosas translúcidas como soporte celular para un dispositivo de cocultivo	Pág.: 1
	RESUMEN DE CAPÍTULOS	Ref.: proes1
		Fec.:

Nº Orden	Descripción de los capítulos	Importe	%
01	Estudio del equilibrio multicomponente	79,69	3,01 %
02	Fabricación de membranas	653,18	24,68 %
03	Caracterización	627,85	23,72 %
04	Dirección de trabajo	1.285,70	48,58 %

TOTAL EJECUCIÓN MATERIAL 2.646,42 €

13 % Gastos Generales 344,03 €

6 % Beneficio Industrial 158,79 €

TOTAL EJECUCIÓN POR CONTRATA 3.149,24 €

21 % I.V.A. 661,34 €

TOTAL PRESUPUESTO C/IVA 3.810,58 €

Asciende el presupuesto proyectado, a la expresada cantidad de:

TRES MIL OCHOCIENTOS DIEZ EUROS CON CINCUENTA Y OCHO CÉNTIMOS

26 de Abril de 2017

LA PROPIEDAD

LA DIRECCIÓN TÉCNICA

LA CONSTRUCTORA

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.: