



Guía para Profesores:  
Laboratorio de síntesis y caracterización de membranas  
poliméricas para aplicación en Salud

---

**LEER ANTES DE REALIZAR NINGUNA OTRA ACCIÓN**

¡ESTA ES LA VERSIÓN 1 (abril 2024) DE LA GUÍA PARA PROFESORES! Esta versión es la versión completa para el conjunto de niveles (4ºESO, 1º y 2º Bachillerato). Durante la actividad se especificarán los detalles de lo que se debe hacer en cada grupo según su nivel (4ºESO, 1º y 2º Bachillerato).

**LEER EL APARTADO CONFIGURACIÓN DEL LABORATORIO Y SEGURIDAD**



## Configuración del Laboratorio y Seguridad

**¡ANTES DE REALIZAR NINGUNA ACCIÓN SOBRE LA QUE SE PUEDA TENER DUDA,  
CONSULTAR A UN PROFESOR IMPLICADO!**

- Antes de comenzar, es imprescindible seguir las indicaciones de seguridad. **Lo primero de todo es acceder a los laboratorios utilizando los equipos de protección individual existentes: gafas, guantes y bata. No es posible acceder a los laboratorios sin estos equipos de protección individual.**
- **Como norma básica los alumnos deben seguir las indicaciones del profesorado todo el tiempo y no tocar ningún objeto del resto del laboratorio.**
- Las disoluciones poliméricas contienen disolventes orgánicos que pueden causar irritaciones en la piel. Se deben manejar por tanto siempre con los guantes de protección de laboratorio.
- Los disolventes, aunque tienen poco riesgo de exposición por inhalación, serán siempre manejados dentro de una campana extractora. Nunca deben sacarse los botes que contengan las disoluciones poliméricas ni los baños de coagulación.
- Solo se sacará de la campana extractora las membranas ya precipitadas cuando el profesorado así lo indique y siempre serán manipuladas con los guantes de protección puestos.



## MISION: Salud y Bienestar

### Objetivo

El objetivo de esta MISIÓN es que los estudiantes dar a conocer la importancia de las membranas poliméricas en el desarrollo puedan conocer los fundamentos de la técnica más común de síntesis de membranas poliméricas y que conozcan las variables que pueden dar lugar a diferentes morfologías y estructuras porosas con potencial para su uso en aplicaciones biomédicas.

Para ello se va a proponer la síntesis de membranas poliméricas usando 2 condiciones diferentes de proceso. Para identificar el efecto que ha tenido esa variación sobre la morfología porosa de la membrana se llevará a cabo la caracterización del tamaño de poro y la permeabilidad de agua.

### Contexto

La ingeniería de tejidos o Ingeniería Tisular (IT) es un campo de vanguardia en la intersección de la biología, la ingeniería y la medicina, cuyo objetivo es crear tejidos biológicos funcionales para reparar o sustituir tejidos dañados o enfermos del cuerpo humano. Implica la aplicación de principios de la biología, la ciencia de los materiales y la ingeniería para diseñar y desarrollar tejidos y órganos artificiales.

El objetivo último de la IT es aportar soluciones a la escasez de órganos de donantes para trasplantes y superar las limitaciones de los tratamientos médicos actuales. Aprovechando las capacidades regenerativas naturales del cuerpo y combinándolas con biomateriales avanzados y técnicas de ingeniería, los ingenieros de tejidos tratan de crear sustitutos biológicos que puedan integrarse perfectamente en el organismo y restablecer la función normal.

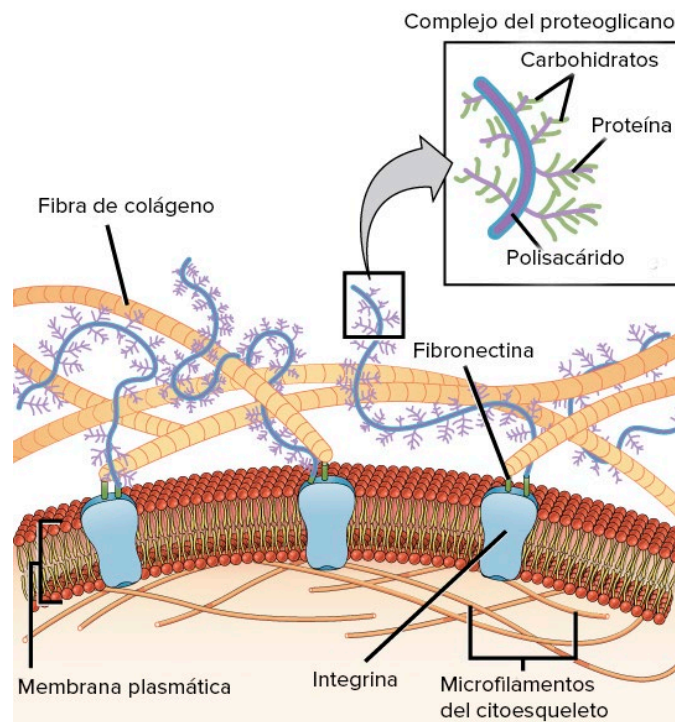
Los componentes clave de la IT son la selección de fuentes celulares adecuadas, el diseño de estructuras de biomateriales que imiten la matriz extracelular y la aplicación de señales bioquímicas y físicas para guiar el crecimiento y la organización de los tejidos. Técnicas como la bioimpresión en 3D, la microfabricación y la biología de las células madre desempeñan un papel crucial en la investigación y el desarrollo de la ingeniería tisular.

La IT es prometedora para una amplia gama de aplicaciones, como la medicina regenerativa, el descubrimiento de fármacos, el modelado de enfermedades y la medicina personalizada. A pesar de los notables avances logrados, aún quedan retos por superar, como conseguir la vascularización de los tejidos artificiales, garantizar la funcionalidad a largo plazo y abordar las consideraciones normativas y éticas.

En general, la IT representa un planteamiento transformador de la atención sanitaria, que ofrece la posibilidad de revolucionar el tratamiento de lesiones, enfermedades y anomalías congénitas proporcionando a los pacientes soluciones a medida que aprovechen los mecanismos de curación del propio organismo.

### Estructuras de biomateriales poliméricos

Un aspecto fundamental de la IT es el diseño de estructuras de biomateriales que imiten la matriz extracelular (MEC, Figura 1), la compleja red de proteínas y moléculas que rodean a las células en los tejidos. Los andamiajes de biomateriales crean un microentorno propicio para la adhesión, proliferación y diferenciación celular y, en última instancia, guían la formación de nuevos tejidos. Además, estas estructuras sirven como vehículos de transporte de factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas bioactivas que regulan el comportamiento celular y el desarrollo tisular. Al imitar la arquitectura y la composición de la MEC, las estructuras de biomateriales pueden dirigir el comportamiento celular y promover funciones específicas de los tejidos, lo que conduce a una regeneración satisfactoria de los tejidos dañados o enfermos.



**Figura 1.** Conexión entre el complejo de fibras de colágeno y fibronectina de la Matriz Extracelular (MEC) y la pared celular o membrana plasmática. Crédito de la imagen: *OpenStax Biología*



Para imitar eficazmente la MEC, las estructuras de biomateriales deben reproducir sus propiedades estructurales y bioquímicas. Esto implica seleccionar biomateriales adecuados y diseñar arquitecturas de andamiaje que se asemejen al entorno del tejido nativo. Los polímeros naturales, como el colágeno, la fibrina y el ácido hialurónico, se utilizan habitualmente por su biocompatibilidad y su capacidad para interactuar con las células. Los polímeros sintéticos como el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y el polietilenglicol (PEG) ofrecen propiedades ajustables y resistencia mecánica, lo que los convierte en materiales versátiles para andamiajes.

Diversas técnicas de fabricación, como el electrospinning, la bioimpresión 3D y el autoensamblaje, permiten crear andamiajes de biomateriales con un control preciso de su arquitectura y composición. También existen otras técnicas de procesamiento de polímeros más tradicionales, como las **técnicas de separación o inversión de fases**, ampliamente utilizadas en la síntesis de membranas poliméricas. Las membranas poliméricas porosas sintetizadas con polímeros biocompatibles han mostrado su capacidad para ser empleadas como estructuras porosas y con geometrías 3D para cultivo celular. Además, permiten una **eficiente integración en biorreactores dinámicos** en diseños similares a los empleados en otras aplicaciones biotecnológicas.

Estas técnicas permiten a los investigadores diseñar andamiajes con estructuras jerárquicas y señales bioquímicas controladas espacialmente **gracias a su porosidad**, que se asemejan a la complejidad de los tejidos nativos. Además, las estrategias de modificación de superficies pueden mejorar la adhesión, proliferación y diferenciación celular mediante la presentación de moléculas bioactivas y ligandos que interactúan con los receptores celulares.

### **Síntesis de membranas por casting e inversión de fases**

Para conseguir membranas altamente porosas, con buenas propiedades mecánicas y una distribución estrecha del tamaño de poros se utiliza el método de separación de fases inducida por no disolventes (NIPS), técnica conocida comúnmente como inversión de fases. La mayoría de las membranas que están disponibles comercialmente han sido desarrolladas a través de este método debido a su simplicidad y flexibilidad a la hora de su fabricación.

En esta técnica se parte de un sistema de al menos tres componentes i) polímero, ii) el disolvente, y iii) el no disolvente (o coagulante), repartidos entre una disolución polimérica (disolvente/polímero) y un baño de precipitación o coagulación (coagulante). También se puede añadir un cuarto componente, normalmente nuevos aditivos como nanomateriales incorporados en la disolución polimérica, o formadores de poros para generar una mayor porosidad en la disolución polimérica. La precipitación de la disolución polimérica sucede cuando se introduce en un baño de coagulación con un no disolvente. Debido a esto, se



generan dos fases: una fase rica en polímero, la cual se convierte en la matriz polimérica formando las membranas después de producirse la precipitación de la disolución; y la otra fase, pobre en polímero, que es la responsable de formar los poros de la membrana.

La combinación de los **fenómenos termodinámicos y cinéticos** producidos durante el proceso de **intercambio de fases** son los causantes de las diferentes formas y tamaños que adquieren los poros de las membranas.

## Guión de la experiencia

### Materiales para la experiencia de síntesis de membranas

- Disponibilidad de EPIs: guantes, gafas y batas
- Disolución de 15 wt% de fluoruro de polivinilideno (PVDF) en N-metilpirrolidona (NMP)
- Baño de coagulación de agua ultrapura
- Baño de coagulación de etanol
- Placa de vidrio
- Cuchillo de casting
- Papel adsorbente
- Acetona para limpieza
- Pinzas
- Micrómetro
- Cronómetro

### Materiales para la experiencia de caracterización de membranas

1. Sistema de permeación de agua
  - Sistema experimental de filtración Amicon Cell (Millipore, filtración perpendicular)
  - Conexión a aire comprimido
  - Agua ultrapura
  - Probeta
2. Porometría de flujo
  - Porómetro de flujo capilar 3G (Anton Paar).

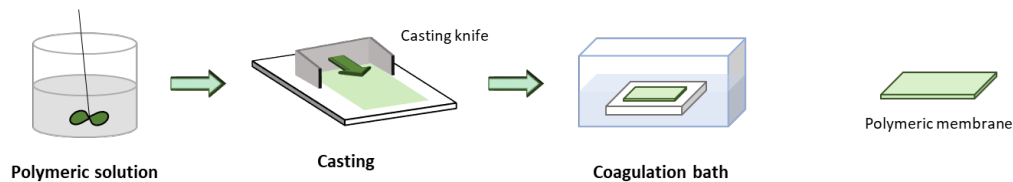
- Conexión a aire comprimido
- Líquido Porefiller

**Procedimiento experimental:**

Los alumnos se dividirán en 2 grupos en los que irán alternando las diferentes técnicas.

1. Síntesis de membranas mediante la técnica de casting e inversión de fases

Las membranas poliméricas planas se sintetizan mediante la técnica de casting (Figura 2)



**Figura 2.** Síntesis de membranas planas mediante la técnica de casting

Paso 1: se ajusta a 200  $\mu\text{m}$  el haz de luz en el cuchillo de casting.

Paso 2: se vierte la disolución polimérica sobre un soporte de cristal

Paso 3: se desliza el cuchillo de casting por encima de la disolución polimérica.

Paso 4: Una vez tenemos la disolución extendida se mete el soporte de vidrio en el baño de coagulación (agua o etanol) y se espera hasta que precipite. SE ANOTA EL TIEMPO DE PRECIPITACION

Paso 5: se sacan las membranas del baño de coagulación y se sumergen en un nuevo baño con agua hasta su uso

Se repetirán los pasos 1-5 usando otro baño de coagulación.

Paso 6 MEDIR ESPESOR DE MEMBRANAS CON MICROMETRO

**Tabla 1.** Tabla de resultados experimentales

Membrana	Baño coagulación	Tiempo de precipitación	Espesor
#	#	segundos	micrómetros
1	Agua		
2	Etanol		

A partir de los resultados experimentales anteriores deben anotar en su plantilla de respuestas la respuesta a las siguientes preguntas:



**Pregunta P1.** *¿Qué coagulante produce una precipitación más rápida del polímero?*

**Pregunta P2.** *¿El espesor de la membrana tiene el mismo grosor del haz de luz del cuchillo de casting empleado? Calcula el porcentaje que supone el espesor medido respecto del fijado en el cuchillo*

**Pregunta P3.** *¿Qué líquido crees que es más viscoso, la disolución polimérica o el disolvente del baño de coagulación? ¿qué se producirá más rápido, la salida del disolvente desde la disolución polimérica o la entrada del coagulante en la disolución polimérica?*

La observación de estas preguntas nos llevará a razonar la influencia de la cinética del intercambio existente entre el disolvente y el coagulante sobre estos factores y la posible morfología de los poros.

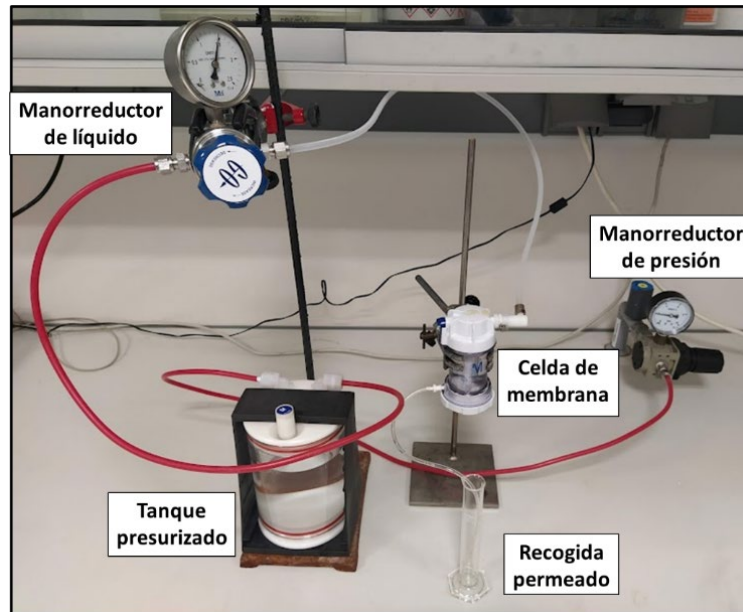
## 2. Caracterización de las membranas sintetizadas en el paso anterior

*NOTA: Por falta de tiempo cada grupo realizará las mediciones de una de las membranas sintetizadas con una de las técnicas indicadas a continuación y se les facilitarán los datos restantes para el análisis de resultados*

### 2.1. Sistema de permeación de agua

Tras la síntesis de las membranas planas por la técnica de inversión de fases se llevará a cabo la caracterización funcional de la membrana con el equipo experimental de filtración perpendicular Amicon (Figura 3) para la caracterización del flujo de agua.





**Figura 3.** Equipo experimental de filtración perpendicular Amicon Cell (Millipore).

Paso 1: Verter el agua ultrapura en el tanque presurizado del sistema experimental.

Paso 2: Cerrar el tanque y asegurarse de que las válvulas de seguridad estén bien selladas.

Paso 3: Introducir la membrana a caracterizar en la celda de membranas (área específica de la membrana  $13,4 \text{ cm}^2$ ). Recortar la membrana para la superficie necesaria.

Paso 4: Cerrar correctamente el sistema y colocarlo con pinzas en el soporte en vertical. Dejar la válvula de seguridad superior (pestillo azul) abierta.

Paso 5: Comprobar que el manorreductor de líquido está completamente cerrado.

Paso 6: Abrir el manorreductor de presión de aire comprimido. Ajustar con cuidado hasta alcanzar una presión de 2 bar.

Paso 7: Abrir progresiva y lentamente el manorreductor de líquido hasta que comience a subir ligeramente la presión.

Paso 8: Comprobar que el agua alimenta la celda de la membrana. Cuando se llene y desaparezcan las burbujas de aire (empieza a salir agua), se debe cerrar la válvula de seguridad de la celda. En este punto se les hace meditar a los estudiantes sobre la siguiente pregunta:

**Pregunta P4.** ¿Cómo llega el agua desde el tanque hasta la celda?

Paso 9: Ajustar la presión del manómetro hasta 1 bar. De forma similar se les hace recapacitar sobre qué significa la lectura de la presión del manorreductor del líquido:



**Pregunta P5.** ¿Qué mide el manorreductor? ¿Por qué marca una presión de 1 bar si el aire en el tanque de agua estaba a 2 bar?

Paso 10: Comenzar las mediciones de volumen acumulado de permeado a través de la membrana. Esto se realizará con ayuda de una probeta cronometrando el tiempo de llenado. Tomar datos durante 15 minutos.

**Tabla 2.** Tabla de resultados experimentales

	Membrana 1 (agua)	Membrana 2 (etanol)
Tiempo minutos	Volumen mL	Volumen mL
0		
5		
10		
15		

En este punto se les hace reflexionar a los estudiantes sobre la siguiente pregunta:

**Pregunta P6.** ¿Por qué pasa agua a través de la membrana?

Eso nos llevará a razonar que la membrana es un filtro, es decir, tiene poros o agujeros que el agua puede atravesar.

### 2.2. Porometría de flujo

El equipo experimental de porometría de flujo se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Equipo experimental de porometría de flujo. Porometer 3G micro (Anton Paar).



Los pasos a seguir serán explicados con más detalle por el tutor de la práctica. De forma general la preparación de la muestra y procedimiento a seguir será:

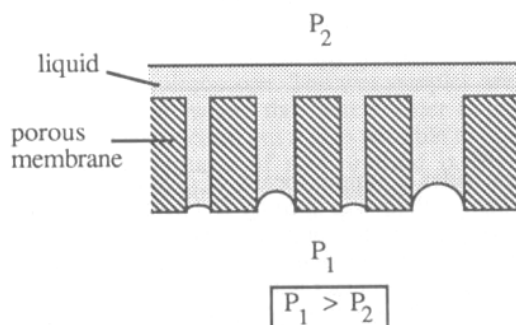
1. Recortar las membranas con los diámetros adecuados para su medición en la celda del equipo.
2. Insertar la membrana en la celda de membrana plana.
3. Mojar la membrana con el líquido Porefiller.
4. Cerrar la celda con cuidado de que esté perfectamente alineada.
5. Fijar la presión de aire de entrada al equipo a 8 bar utilizando el manorreductor.
6. Programar la rampa de presiones adecuada y seleccionar el modo de operación del programa que permita llevar a cabo el estudio de permeación de aire en membrana húmeda y seca.
7. Al finalizar las mediciones, despresurizar por completo el equipo fijando el manorreductor a 0 bar.
8. Análisis de los resultados en el software del equipo.

**Pregunta P7.** *¿Qué se hace pasar a través de la membrana en este equipo? ¿qué es lo que mide en continuo el equipo?*

Los alumnos tienen que identificar que lo que cruza la membrana esta vez es aire y que lo que se medirá es el caudal de aire que pasa de forma continua.

**Pregunta P8.** *¿Por qué se obtienen 2 curvas diferentes cuando la membrana se mide en seco y cuando se mide mojada con el porefiller?*

En esta pregunta se les explica que el líquido moja completamente los poros bloqueándolos tal y como se muestra en la figura 5. Si la presión no es suficiente para expulsar el líquido de los poros no se observa flujo, mientras que cuando se supera la presión que libera el poro se empieza a observar paso de aire.



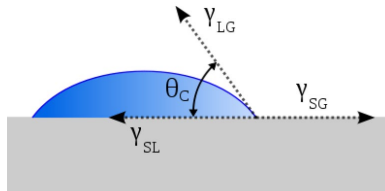
**Figura 5.** Representación de una membrana porosa impregnada en líquido porefiller.

**Pregunta P9.** ¿Cómo se obtiene el tamaño del poro de las membranas a través de ambas curvas?

En este punto se da a conocer que la relación del tamaño de poro con la presión está relacionada con la ecuación de Washburn que nos dice que para un líquido con una tensión superficial definida que penetra en el poro, hay que ejercer un mínimo de presión para sacar el líquido y destaponar el poro:

$$d_p = \frac{0.04\gamma}{P} \cos \theta$$

Como el líquido que rellena los poros lo moja completamente, el líquido forma un ángulo de  $0^\circ$  con el poro y por tanto el valor de su coseno es 1 (Figura 6).



**Figura 6.** Representación del ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie (por ejemplo un poro). Cuando el líquido es repelido por la superficie del material la gota del líquido forma un ángulo  $>90^\circ$ , pudiendo ser  $180^\circ$  si se forma una gota completamente esférica (por ejemplo el agua en superficies repelentes al agua). Por el contrario, si el líquido moja perfectamente la superficie, el líquido se aplasta sobre el material (ángulo  $=0^\circ$ ).

## Relación estructura-función

En este punto de la misión se trata que los estudiantes puedan realizar un simple análisis cuantitativo entre los valores de permeabilidad obtenidos y su relación con las propiedades morfológicas de la porosidad de las membranas sintetizadas.

Para el cálculo de la permeabilidad se necesita calcular el flujo  $J$  ( $\text{mL}/(\text{min} \cdot \text{cm}^2)$ ) que permea a través de las membranas. Este cálculo se lleva a cabo a partir de la siguiente expresión:

$$J = \frac{\Delta V}{\Delta t * A_m}$$

Siendo  $\Delta V$  el cambio de volumen acumulado de agua recogido por unidad de tiempo  $\Delta t$  y por el área de membrana usada,  $A_m$ . A partir del valor de flujo  $J$ , se puede determinar la permeancia o permeabilidad,  $K_p$  ( $\text{mL}/\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{bar}$ ):

$$K_p = \frac{J}{\Delta P}$$

Siendo  $\Delta P$  la presión transmembranal aplicada en los ensayos de flujo.



A partir de estos cálculos generar la siguiente Tabla:

**Tabla 3.** Tabla de cálculos de flujo y permeabilidad promedio

	$J$ (mL/min*cm <sup>2</sup> )	$K_p$ (mL/min*cm <sup>2</sup> *bar):
Membrana 1 (agua)		
Membrana 2 (etanol)		

Asumiendo que el flujo de agua a través de las membranas se puede suponer que cumple la ley de Hagen-Poiseille descrita por la siguiente ecuación:

$$J = \frac{\varepsilon r^2 \Delta P}{8\eta\tau \Delta x}$$

Siendo  $J$  (mL/ min\*cm<sup>2</sup>) el flujo de la membrana  $\varepsilon$  (adimensional) la porosidad de la membrana,  $r$  (m) el radio del poro medio de la membrana,  $\tau$  (adimensional) la tortuosidad de los poros (que adquiere valores entre 1 y 6 de forma habitual),  $\Delta x$  (m) el espesor de la membrana,  $\eta$  (cP) la viscosidad del agua y  $\Delta P$  (bar) la presión transmembranal.

**Pregunta P10.** De forma cualitativa ¿Qué parámetro morfológico tiene más influencia sobre los valores de flujo obtenidos?

## Conexión con los objetivos de Desarrollo Sostenible

La IT se cruza con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) de Salud de varias maneras significativas, contribuyendo al avance de la asistencia sanitaria y el bienestar, al tiempo que promueve la sostenibilidad. La interacción entre la IT y el ODS de Salud puede entenderse a través de los siguientes puntos clave:

1. *Mejora del acceso a la atención sanitaria:* La IT tiene el potencial de abordar retos sanitarios críticos proporcionando soluciones alternativas para el trasplante de órganos y la reparación de tejidos. Con una creciente demanda mundial de órganos que supera la oferta disponible, los órganos y tejidos obtenidos por ingeniería tisular ofrecen un enfoque sostenible para satisfacer esta necesidad, reduciendo la dependencia de la donación y el trasplante de órganos.



2. *Mejores opciones terapéuticas*: Al desarrollar tejidos biológicos funcionales, la ingeniería tisular amplía las opciones terapéuticas para tratar una amplia gama de afecciones médicas, como lesiones traumáticas, enfermedades degenerativas y anomalías congénitas. Esto contribuye a mejorar los resultados sanitarios y la calidad de vida de los pacientes, en consonancia con la meta de los ODS de garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.

3. *Reducción de los costes sanitarios*: La IT puede reducir los costes sanitarios asociados a las enfermedades crónicas y los tratamientos a largo plazo. Al proporcionar soluciones regenerativas que abordan las causas profundas de las afecciones médicas, la ingeniería tisular puede disminuir la carga económica de los sistemas sanitarios y mejorar la rentabilidad, contribuyendo así al objetivo de lograr una cobertura sanitaria universal.

4. *Promoción de prácticas sostenibles*: La IT promueve la sostenibilidad utilizando biomateriales y andamios biocompatibles derivados de recursos renovables o materiales biodegradables. Al incorporar prácticas sostenibles en los procesos de diseño y fabricación de biomateriales, la ingeniería tisular minimiza el impacto ambiental y el consumo de recursos, alineándose con los objetivos más amplios del desarrollo sostenible.

5. *Avance de las tecnologías de bioimpresión*: Las nuevas tecnologías de bioimpresión permiten la deposición precisa de células y biomateriales para fabricar tejidos y órganos complejos. Estas tecnologías ofrecen enfoques personalizables y escalables para la ingeniería de tejidos, permitiendo la producción a demanda de tejidos específicos para cada paciente y reduciendo la necesidad de ensayos con animales y procesos de fabricación tradicionales.

6. *Hacer frente a las disparidades sanitarias mundiales*: La IT tiene el potencial de hacer frente a las disparidades sanitarias mundiales aportando soluciones innovadoras accesibles y adaptables a diversos entornos sanitarios. Mediante esfuerzos de investigación en colaboración e iniciativas de intercambio de conocimientos, la IT puede facilitar la transferencia de tecnologías y conocimientos especializados a regiones con recursos limitados, contribuyendo así a la prestación equitativa de asistencia sanitaria en todo el mundo.

En resumen, la interacción entre la IT y el ODS relativo a la salud pone de relieve el potencial de la medicina regenerativa para impulsar avances en la atención sanitaria y, al mismo tiempo, promover la sostenibilidad y hacer frente a los retos sanitarios mundiales. Al aprovechar las tecnologías innovadoras y las colaboraciones interdisciplinarias, la IT contribuye a la consecución de la cobertura sanitaria universal y a la mejora de los resultados sanitarios para las personas y las comunidades de todo el mundo.

## Vinculación con el trabajo de investigación del grupo TAB en materia de membranas y dispositivos de membranas poliméricas en el campo de la salud

El grupo de investigación Tecnologías Ambientales y Bioprocesos (TAB) de la Universidad de Cantabria en colaboración con el grupo de investigación Biología Celular del Núcleo del Instituto de Investigación biomédica Marques de Valdecilla IDIVAL desarrolla una línea de investigación dedicada a la síntesis de nuevos materiales de membrana biopoliméricos funcionalizados con grafeno para el desarrollo de modelos neuronales, como la barrera hematoencefálica o de enfermedades de la motoneurona, y modelos de cáncer. El objetivo es implantar estos nuevos materiales en dispositivos que permitan su uso en la clínica orientado hacia la medicina personalizada.

### Análisis, discusión y conclusiones

En este punto, se pide a los estudiantes que analicen los resultados obtenidos y elijan tras discutirlos dentro del equipo, cual de las siguientes fotos (Membrana A o Membrana B) se correspondería con una membrana sintetizada usando agua como coagulante (Membrana 1) y cuál con una sintetizada usando etanol como coagulante (Membrana 2):

