



Diseñamos actividades de aprendizaje

DATOS IDENTIFICATIVOS

MÁSTER: Máster Universitario Ingeniería Biomédica

ASIGNATURA: Advanced tissue engineering and regenerative medicine

Nº ECTS: 4.5

TIPO DE ASIGNATURA:

- Troncal
 Optativa
 Libre elección

CURSO:
1º

TAMAÑO DE GRUPO:

- Pequeño: menor de 20 alumnos
 Medio: de 20 a 50 alumnos
 Grande: mayor de 50 alumnos

COMPETENCIAS QUE SE TRABAJAN EN LA ASIGNATURA - CON LA ACTIVIDAD

ESPECÍFICAS:

- Capacidad de formular y resolver problemas mediante el empleo de tecnologías innovadoras en el área de la ingeniería biomédica
- Saber emplear de forma efectiva la instrumentación y los métodos de observación del área biomédica para el estudio y análisis de los sistemas complejos del área
- Ser capaz de diseñar, implementar y gestionar experimentos adecuados, analizar sus resultados y sacar conclusiones en el ámbito de la ingeniería biomédica
- Ser capaz de analizar, proponer y construir soluciones a problemas complejos en entornos emergentes y multidisciplinares asociados a la ingeniería biomédica, con una visión global.

GENÉRICAS/TRANSVERSALES:

- CT01. Comprensión e integración
- CT02. Aplicación y pensamiento práctico
- CT03. Análisis y resolución de problemas
- CT04. Innovación, creatividad y emprendimiento
- CT05. Diseño y proyecto
- CT06. Trabajo en equipo y liderazgo
- CT07. Responsabilidad ética, medioambiental y profesional
- CT08. Comunicación efectiva
- CT09. Pensamiento crítico
- CT10. Conocimiento de problemas contemporáneos
- CT11. Aprendizaje permanente**
- CT12. Planificación y gestión del tiempo
- CT13. Instrumental específica



Resultado/s de aprendizaje a alcanzar con la actividad	<ol style="list-style-type: none">1. Diseñar un plan de acción para la realización del experimento correctamente para lograr sus objetivos en base a los parámetros de síntesis proporcionados2. Adaptar las modificaciones a realizar durante la síntesis de micropartículas en función de las necesidades del proceso establecido en el dossier de prácticas
Contenidos que se trabajan: enumerar los temas de la asignatura que se trabajan con esta actividad y que permiten alcanzar los resultados de aprendizaje anteriores.	<ul style="list-style-type: none">• LESSON 1. Microparticles, microvesicles and micelles
Nombre de la actividad. Por ejemplo: mapa conceptual, actividad grupal de comunicación, tarjetas de preguntas, etc.	<ul style="list-style-type: none">• Practice 1: Microparticles and microvesicles
Desarrollo: describir los pasos de la actividad , de tal modo que cualquier otro profesor pueda llevarla a la práctica. Para ello, los pasos son: <ul style="list-style-type: none">- Especificar si es una tarea individual o grupal (en este caso número de alumnos por grupo)- Instrucciones/reglas de la actividad a comunicar al/los alumno/s.- Tarea concreta a realizar por el/los alumno/s. Si la tarea incluye diferentes pasos, hay que indicar cada uno de los mismos.	<ul style="list-style-type: none">• Se trata de una actividad grupal de 4-5 alumnos por grupo.• Se le remitirá al dossier de prácticas donde se especifica el objetivo de la práctica, los materiales a emplear, y el proceso a seguir además de especificarles qué parámetros de síntesis le corresponde a cada grupo.• Tareas descritas paso a paso al final de este documento como documentación anexa.
Evaluación , determinar: <ul style="list-style-type: none">- El producto final que entregarán los alumnos y que quedará como testimonio de la actividad (memoria, proyecto, informe con las conclusiones).- El formato, los requisitos y criterios a los que se tienen que ceñir.- Las normas de presentación de la actividad: a través de tareas, por correo electrónico, en espacio compartido...- Los plazos de entrega.- Las actividades de revisión y tutoría para proporcionar retroalimentación a los alumnos.- Los criterios de evaluación.	<ul style="list-style-type: none">- Como documento final se entregará el propio dossier de prácticas de laboratorio correctamente rellenado.- Formato estipulado por el propio dossier.- Se entregará al final de la práctica de laboratorio.- El documento corregido estará a disposición del alumno para la resolución de dudas mediante tutorías.- 4 cuestiones de 2,5 ptos sobre 10 ptos.
Duración: indicar el tiempo aproximado requerido para la realización de la actividad.	Alrededor de 2,5h



<p>Recursos necesarios: describir detalladamente el material que se necesita para la ejecución de la tarea y su localización en la plataforma (Recursos, anexo a la tarea, correo...)</p>	<p>Documentos PDF: LESSON 1: Microparticles and microvesicles PRACTICAL SESSION 1: Drug loading during microparticle fabrication</p> <p>Ambos en el apartado de recursos de la asignatura</p>
<p>Recomendaciones: recapitula las limitaciones y dificultades que puede presentar la actividad, así como las condiciones para hacerla más eficiente.</p>	<p>Lo bien que se gestione el grupo de alumnos para la realización de la práctica.</p> <p>La aplicación de los conocimientos aportados por cada uno de los componentes del grupo. Debido a que suelen ser grupos de carreras muy diversas y muy heterogéneos.</p> <p>El entendimiento de los conceptos de entrecruzamiento físico y el papel del Calcio como ión entrecruzante para la resolución de los posibles problemas que puedan pasar durante la práctica.</p> <p>Para hacerla más eficiente:</p> <ul style="list-style-type: none">-Buena introducción por parte del profesor.-Buena preparación de las instalaciones permitiendo que todo el material sea de fácil acceso para los estudiantes.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



DOCUMENTACIÓN ANEXA

LAB PRACTICE I: 'Drug' loading during microparticle fabrication

Objective

The aim of the practical session is to fabricate hydrophilic microparticles, based on sodium alginate, an anionic polysaccharide at neutral pH that crosslinks spontaneously in the presence of divalent soluble cations, through the *water-in-oil* emulsion technique. The microparticles will be loaded with a food colour to (i) enhance the identification of the particles in suspension and to (ii) serve as a model of the loading of the particles with different molecules (e.g. bioactive drugs, growth factors or chemotherapeutics).

Background

There are several different strategies for microparticle (MP) manufacturing depending on the organic/inorganic nature of the materials, the desired particle size and the application (top-down techniques, dendrimerisation, stamp moulding...). Among them, emulsion method is the most widely used for drug-loaded polymer-based microparticles due to its versatility for molecules of different nature, its relative simplicity (compared to other techniques) and its capacity of tuning production variables with minor changes in fabrication parameters.

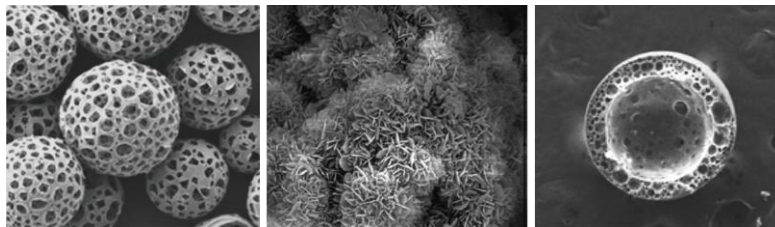


Figure 1. Electron microscopy images of porous poly(ethylene glycol), calcium phosphate cement and hollow polystyrene microparticles (left to right)

Depending on the hydrophilicity of the polymer used as a drug carrier, the emulsion can be performed under *water-in-oil* (W/O) or *oil-in-water* (O/W) conditions. Sometimes is even possible to create a double emulsion (W/O/W or O/W/O) to create core-shell MPs or retain smaller spheres within a protective capsule. Since the techniques are based in an equilibrium between an organic and an inorganic phase, there are two main features that condition the successful creation of MPs: the **stability** of droplets during the emulsion and their **precipitation** to obtain solid microstructures.

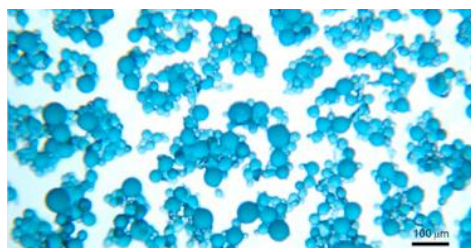


Figure 2. Genipin-crosslinked chitosan microparticles obtained by W/O emulsion.

The alginic acid (or sodium alginate as a salt) is a polysaccharide composed by alternating units of D-mannuronate and L-guluronate, which are stereoisomers. Such a unique structure allows the macromolecule chains to crosslink between them physically in presence of divalent cations such as ionic calcium Ca^{2+} in a so-called egg box structure. This phenomenon can be exploited for the fabrication of MPs, by adding the forementioned cations to the inorganic (aqueous) phase, where the alginate remains dissolved, to solidify the droplets formed in the emulsion, that remain stable at room temperature.

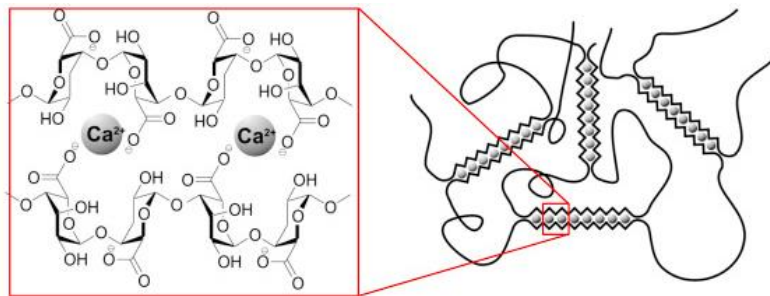


Figure 3. Physical crosslinking of alginate macromolecules through Ca^{2+} ions in "egg-box" model.

Materials

Reagents

- Alginic acid sodium salt, from brown algae.
- Calcium carbonate, CaCO_3 (MW = 100.09 g/mol).
- Acetic acid glacial, CH_3COOH (MW = 60.05 g/mol).
- Calcium chloride dihydrate, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW = 147.01 g/mol).
- Food dye Fast Green FCF.
- Surfactant Tween 20.
- Commercial olive oil.
- Deionised water.

Hardware and glassware

- 250 ml ISO flask, containing a 1% Tween 20 solution
- 50 ml ISO flask, containing a 2% sodium alginate solution with Fast Green FCF dye
- 250 ml baker
- 250 ml separatory funnel
- 4x 50 ml Falcon centrifuge tubes
- Watch glass
- Rubber propipette / pipette pump
- 25 ml glass pipettes

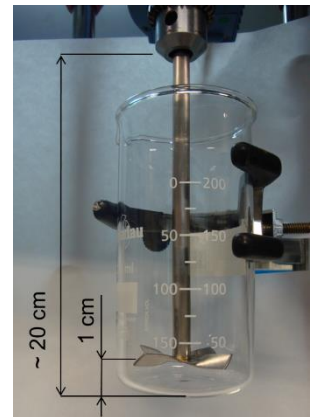
Equipment:

- Emulsion agitator + paddles 4-blade impeller
- Centrifuge
- Optical microscope

Procedure

1. Assembly and solution preparation

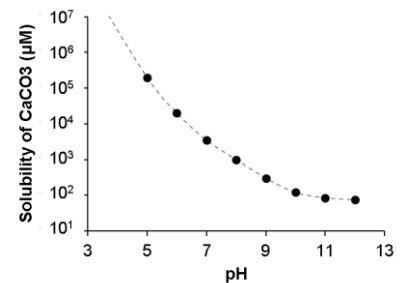
- Prepare a 2% w/v solution of sodium alginate with a touch (< 10 mg) of Fast Green FCF dye in deionised water. Stir the solution overnight (the solution will be already prepared for the practical session, for obvious reasons).
- Fit the impeller within the central channel of the agitator. Make sure it is centred and secured, with the blades at approximately 20 cm from the agitator.
- Fasten the 250 ml baker to the ring stand with a clamp, aligned with the impeller. Level it so the impeller blades remain at 1 cm from the bottom (see Picture 1).
- Switch the agitator on and let it rotate freely without increasing the speed (just the inertia). Make sure the blades does not collide with the baker. Switch it off.
- Pour 100 ml of olive oil in the baker (make use of the graded scale) and switch the agitator in again.



Picture 1. Assembly of the Baker and relative distances

2. Alginate microparticles fabrication

- Weight 100 mg of calcium carbonate (CaCO_3). Make sure the powder is properly dispersed (shred it with a spatula when necessary).
- Set the velocity of the agitator at \square 600 / \square 900 / \square 1200 rpm.
- Pour \square 10 / \square 20 ml of the alginate solution. Wait for 2 min.
- Add the CaCO_3 to the agitating mixture. The powder will not dissolve ($\text{pH} \approx 7$, see the plot on the right), but the particles will be preferably dispersed in the aqueous phase.
- Carefully add 200 μl of acetic acid glacial with a micropipette, ensuring all the acid reaches the mixture (any drop in neither the baker wall nor the impeller). Allow the emulsion to stabilize for 20 min.



3. Washing and separation

- Add 1.85 g of calcium chloride (CaCl_2) to the 250 ml ISO flask with an aqueous 1% Tween 20 solution on it (Tween 20 - or Polysorbate 20 - is a non-ionic surfactant). Stir the solution vigorously (CaCl_2 is easily dissolved in water).
- Slow down the agitator and switch it off. Pour 150 ml of the Tween 20 + CaCl_2 solution into the baker. Release the baker and replace the clamp for the funnel ring, in order to place vertically the separatory funnel. Draw the emulsion off from the baker to the separatory funnel (ensure the lower valve is closed before doing it). Let the emulsion separate into two phases for 10 min.

- c) Collect the bottom fraction of the mixture in the 50 ml Falcon centrifuge tubes by opening the lower valve of the funnel. Prevent the oily phase from flowing out the funnel.
- d) Depending on the size of the microparticles obtained so far, follow the corresponding instructions:
 - d1) provided that the microparticles precipitate spontaneously in 2 – 5 min, carefully drain out the supernatant fluid with a 25 ml glass pipette. Try not to disturb the MPs laid in the collecting cone of the Falcon tubes.
 - d2) if there is no noticeable change in the liquid medium after 5 min, centrifuge the Falcon tubes at 2000 rpm for 2 min. Then proceed with d1).
- e) Distribute the remaining 100 ml of Tween 20 + CaCl₂ solution amongst the Falcon tubes and close them. Reverse-stir the Falcon tubes to perform a second wash of the MPs.
- f) Dry the microparticles by means of a Büchner funnel setup connected to a vacuum pump. Collect the MPs that remained in the filter paper and put them in a Petri dish.

4. MPs visualization and sizing

- a) Place the Petri dish under the 10x objective of the phase-contrast microscope (Picture 2). Turn the light source on and select the proper objective. Make sure the MPs are not clustered; disperse them when necessary to have a clearer vision of them.



Picture 2. Optical phase-contrast microscope and visualization software

- b) Measure the diameter of, at least, 15 randomly-selected MPs at different areas of the Petri dish. If some microparticles are elliptical, try to avoid measuring the minor/major axis as the diameter (or measure both and provide the arithmetic mean).

1	μm	6	μm	11	μm
2	μm	7	μm	12	μm
3	μm	8	μm	13	μm
4	μm	9	μm	14	μm
5	μm	10	μm	15	μm

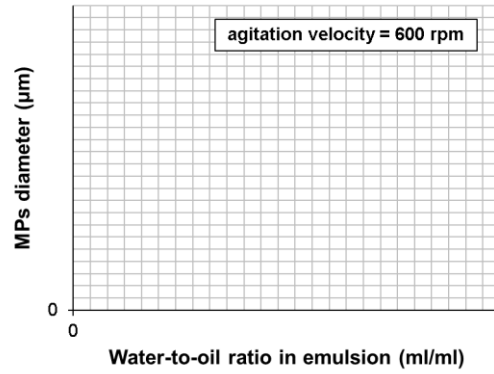
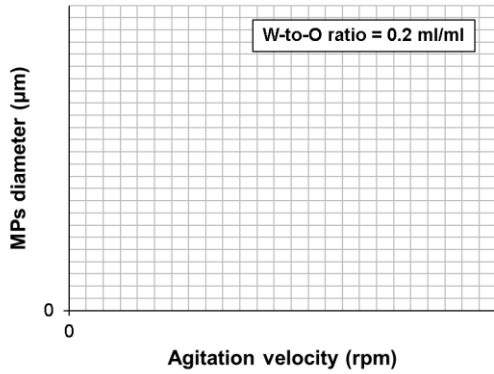
$\bar{X} = \dots \mu\text{m}$

Questions

- Calculate the standard deviation of your MP sample distribution (N = 15).

Note: $\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i |x_i - \bar{x}|^2}{N-1}}$ $\sigma = \dots\dots\dots \mu\text{m}$

- Share your data with the rest of the groups, and plot the following graphs ($\mu \pm \sigma$):



- Provide a brief explanation for the differences found between diameters of the MPs when different emulsion conditions are tested¹.

- Which element contributed to the **stability** of the formed droplets in the emulsion? How droplets were **precipitated** in this case to obtain them in a solid state (as MPs)?

¹ According to the Young-Laplace equation, the gradient of pressure Δp (Pa) needed to obtain spherical droplets of radius r (m) of a liquid substance with a surface tension of γ (N/m) with the continuous medium is $\Delta p = 2\gamma/r$ (just for if it might be useful).