



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**Desarrollo de una biotinta híbrida de  
hidroxiapatita y recombinameros tipo elastina  
para regeneración ósea**

Autora:

**Dhamar Catalina Araujo Polo**

Tutor:

**Israel González de Torre**

Valladolid, 30 de junio de 2023

---

|               |                                                                                                                  |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TÍTULO:       | <b>Desarrollo de una biotinta híbrida de hidroxapatita y recombinameros tipo elastina para regeneración ósea</b> |
| AUTOR/A:      | <b>Dhamar Catalina Araujo Polo</b>                                                                               |
| TUTOR/A:      | <b>Israel González de Torre</b>                                                                                  |
| DEPARTAMENTO: | <b>Departamento de Química Analítica</b>                                                                         |

---

---

**TRIBUNAL**

---

PRESIDENTE:

SECRETARIO:

VOCAL:

SUPLENTE 1:

SUPLENTE 2:

---

---

FECHA:

CALIFICACIÓN:

---



# Índice

|        |                                                                       |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | Resumen .....                                                         | 1  |
| 2.     | Abstract.....                                                         | 2  |
| 3.     | Introducción.....                                                     | 3  |
| 3.1.   | Regeneración ósea.....                                                | 4  |
| 3.2.   | Impresión 3D en medicina.....                                         | 4  |
| 3.3.   | Biotintas.....                                                        | 6  |
| 3.4.   | Biomateriales.....                                                    | 8  |
| 3.4.1. | Hidroxiapatita.....                                                   | 9  |
| 3.4.2. | Recombinámeros de tipo elastina.....                                  | 9  |
| 3.4.3. | Metodología "Click" en la Creación de Biotintas.....                  | 11 |
| 4.     | Objetivos.....                                                        | 13 |
| 5.     | Materiales y métodos .....                                            | 14 |
| 5.1.   | ELRs Utilizados.....                                                  | 14 |
| 5.2.   | Otros reactivos.....                                                  | 14 |
| 5.3.   | Equipamiento utilizado.....                                           | 15 |
| 5.4.   | Modificación de los Polímeros .....                                   | 15 |
| 5.4.1. | Modificación del ELR VKV con ciclooctino y HRGD con azida.....        | 15 |
| 5.4.2. | Modificación del ELR VKV con azida sódica.....                        | 17 |
| 5.5.   | Caracterización de los polímeros.....                                 | 18 |
| 5.5.1. | Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....     | 18 |
| 5.5.2. | Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....                       | 19 |
| 5.5.3. | Espectroscopía de Resonancia Magnética (RMN).....                     | 21 |
| 5.6.   | Química "click" entre los polímeros modificados .....                 | 23 |
| 5.7.   | Reología.....                                                         | 24 |
| 6.     | Resultados y discusión.....                                           | 26 |
| 6.1.   | Caracterización de polímeros.....                                     | 26 |
| 6.1.1. | Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) ..... | 26 |
| 6.1.2. | Cálculo de la Temperatura de Transición Inversa.....                  | 29 |
| 6.1.3. | Cálculo del porcentaje de polímero modificado .....                   | 30 |
| 6.2.   | Formación de geles mediante química click .....                       | 33 |
| 6.3.   | Pruebas reológicas.....                                               | 35 |
| 7.     | Conclusiones y líneas futuras de investigación .....                  | 56 |
| 8.     | Bibliografía.....                                                     | 58 |
| 9.     | Anexos.....                                                           | 63 |

## **Glosario de abreviaturas**

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría Diferencial de Barrido)

ELRs – Elastin-like recombinaers (Recombinámeros tipo elastina)

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier)

HAp – Hidroxiapatita

LVE – Límite lineal viscoelástico

PEG – Polietilenglicol

PLA – Polilactato

RMN – Resonancia magnética nuclear

TC – Tomografía computerizada

TMS – Tetrametilsilano

Tt – Temperatura de transición

TTI – Temperatura de transición inversa



# 1. Resumen

En el presente Trabajo Fin de Grado, se ha llevado a cabo el inicio del desarrollo y la caracterización de una biotinta compuesta por recombinámeros tipo elastina (ELRs) e hidroxiapatita (HAp), con el objetivo de crear materiales avanzados para la regeneración ósea. Los ELRs utilizados, VKV-ciclooctino, VKV-N<sub>3</sub> y HRGD-N<sub>3</sub>, fueron modificados químicamente mediante la metodología "click", lo que permitió la formación de geles con propiedades mecánicas y viscoelásticas adecuadas para aplicaciones biomédicas.

Se realizó una caracterización exhaustiva de los ELRs modificados utilizando técnicas como Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Estos análisis confirmaron la incorporación exitosa de los grupos funcionales deseados, así como la estabilidad térmica y estructural de los polímeros modificados.

Posteriormente, se investigó la formación de geles mediante la combinación de los ELRs modificados con diversas concentraciones de hidroxiapatita, utilizando la metodología "click". Los estudios reológicos realizados revelaron que la incorporación de HA aumenta la rigidez de los geles, como lo indican los incrementos en los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ). Sin embargo, también se observó un aumento en la viscoelasticidad, lo que sugiere la necesidad de equilibrar estos parámetros para obtener un material que cumpla con los requisitos específicos de cada aplicación.

Finalmente, se evaluó el efecto de la formulación de la biotinta, incluyendo la adición de solventes como el etanol, en la homogeneidad y estabilidad de los geles. Los resultados subrayan la importancia de optimizar la composición de la biotinta para garantizar su rendimiento óptimo en la regeneración ósea.

Este trabajo establece una base sólida para futuras investigaciones orientadas a la optimización y aplicación de biotintas basadas en ELRs y HAp, con el potencial de mejorar significativamente las técnicas de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

## 2. Abstract

In this Bachelor's Thesis, the development and characterization of a bioink composed of elastin-like recombinamers (ELRs) and hydroxyapatite (HAp) was initiated, aiming to create advanced materials for bone regeneration. The ELRs used, VKV-cyclooctyne, VKV-N<sub>3</sub> and HRGD-N3, were chemically modified through the "click" methodology, enabling the formation of gels with mechanical and viscoelastic properties suitable for biomedical applications.

A comprehensive characterization of the modified ELRs was carried out using techniques such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), and Differential Scanning Calorimetry (DSC). These analyses confirmed the successful incorporation of the desired functional groups, as well as the thermal and structural stability of the modified polymers.

Subsequently, the formation of gels was investigated by combining the modified ELRs with various concentrations of hydroxyapatite using the "click" methodology. Rheological studies revealed that the incorporation of HAp increases the stiffness of the gels, as indicated by the increases in storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) moduli. However, an increase in viscoelasticity was also observed, suggesting the need to balance these parameters to obtain a material that meets the specific requirements of each application.

Finally, the effect of the bioink formulation, including the addition of solvents such as ethanol, on the homogeneity and stability of the gels was evaluated. The results underscore the importance of optimizing the bioink composition to ensure its optimal performance in bone regeneration.

This work establishes a solid foundation for future research aimed at the optimization and application of bioinks based on ELRs and HAp, with the potential to significantly enhance tissue engineering and regenerative medicine techniques.

### 3. Introducción

La bioimpresión 3D es una tecnología diseñada para recrear estructuras complejas en forma de *scaffolds* capaces de contener células. Mediante el uso de la técnica *layer by layer* se puede imitar un tejido natural integrando células, biomateriales y señales bioactivas en el espacio tridimensional. Esta técnica permite recrear patrones complejos como es la estructura porosa e irregular del hueso destaca el gran potencial en aplicaciones biomédicas [1][4].

La bioimpresión 3D tiene sus raíces en la impresión 3D tradicional, que comenzó en la década de 1980 con la invención de la estereolitografía por Charles Hull en 1986. Inicialmente, la impresión 3D se centraba en la creación de objetos poliméricos, pero a finales de los años 90, esta tecnología se adaptó para imprimir células vivas en patrones bidimensionales. En el año 2000, Thomas Boland dio un paso crucial al modificar una impresora de inyección de tinta para imprimir células en un medio biológico, sentando así las bases de lo que hoy se conoce como bioimpresión [2].

Entre las principales ventajas de la bioimpresión 3D destaca la simplicidad en la preparación, que puede reemplazar los complejos procesos de desarrollo de moldes para tejidos. Esta tecnología ha demostrado su capacidad para producir *scaffolds* altamente porosos, con una interconectividad óptima que favorece un mejor transporte de nutrientes y una rápida integración con los tejidos circundantes. Además, la posibilidad de diseñar *scaffolds* específicos para formas anatómicas complejas de manera rápida y reproducible resalta el papel fundamental de la bioimpresión 3D en el avance de la medicina personalizada [1][4].

Más allá de la creación de estructuras tridimensionales, la bioimpresión también permite la colocación precisa de células vivas y biomateriales en capas sucesivas, lo que facilita la producción de tejidos funcionales que imitan más fielmente las propiedades biológicas y mecánicas de los tejidos naturales [4]. Además, la capacidad de integrar biomoléculas, factores de crecimiento y señales químicas en los *scaffolds* impresos crea entornos más propicios para la regeneración tisular y el crecimiento celular controlado [5].

### **3.1. Regeneración ósea.**

El hueso es un tejido muy activo e indispensable en diversas funciones del cuerpo humano, como la protección de órganos y soporte mecánico [3]. Su metabolismo le permite, mediante el proceso de remodelación, adaptar su estructura ante estímulos mecánicos, y si es necesario, reparar daños estructurales. Sin embargo, esta capacidad de autorregeneración se puede ver comprometida por enfermedades, daños graves o extensos, o en áreas sometidas a carga mecánica [6].

Uno de los factores que facilita la regeneración es la estructura compleja jerarquizada que abarca de nanoescala a macroescala. El hueso posee componentes orgánicos, principalmente nanofibras de colágeno, y componentes inorgánicos, principalmente hidroxiapatita nanocristalina [6]. Esta compleja organización de la matriz extracelular orgánica y la parte inorgánica forma una estructura porosa crucial para la regeneración [7].

Para que la regeneración sea posible y óptima es necesario cumplir ciertas condiciones: (i) la creación de un entorno apropiado para el crecimiento de elementos osteogénicos, conocido como osteoconducción; (ii) la estimulación de células indiferenciadas para formar osteoblastos, un proceso llamado osteoinducción; y (iii) la presencia de osteoblastos que responsables de la formación del nuevo hueso, denominado osteogénesis [8].

El método clínico estándar para la regeneración ósea es el injerto óseo, que puede involucrar autoinjertos o aloinjertos. Sin embargo, este enfoque presenta numerosas limitaciones, como el posible rechazo del injerto, el riesgo de infección, morbilidad del sitio donante e incluso la limitada disponibilidad de injertos óptimos [4]. La bioimpresión 3D se presenta como una solución prometedora a estos desafíos, permitiendo la creación de *scaffolds* impresos a medida que optimizan el proceso de regeneración ósea [2].

### **3.2. Impresión 3D en medicina.**

La bioimpresión 3D ha demostrado ser una herramienta prometedora en la medicina regenerativa, permitiendo la fabricación de *scaffolds* personalizados que imitan la arquitectura del tejido óseo natural. Estos *scaffolds* son esenciales para la

regeneración de tejidos complejos, ya que pueden ser diseñados para facilitar la osteoconducción, la osteoinducción y la osteogénesis, integrando biotintas que contienen células vivas y factores bioactivos [1][4]. Este avance tecnológico ha abierto la puerta a la creación de órganos y tejidos personalizados, mejorando significativamente las posibilidades de regeneración y trasplante [5].

Uno de los mayores logros de la bioimpresión 3D en medicina es su capacidad para controlar de manera precisa la distribución celular y la composición de los biomateriales en estructuras tridimensionales [9]. Además, esta tecnología permite la creación de modelos específicos basados en la anatomía de cada paciente, lo que facilita la personalización de los tratamientos y mejora los resultados clínicos [2].

El proceso de fabricación de tejidos bioimpresos humanos en 3D consiste en tres partes importantes: preprocesamiento, procesamiento y posprocesamiento. Durante el preprocesamiento, primero se cultivan las células humanas y luego el modelo de andamio se diseña para la bioimpresión. Estas células se aíslan y cultivan in vitro, y las técnicas de imagenología como la resonancia magnética nuclear, RMN, o la tomografía computarizada, TC, se utilizan para generar datos estructurales y morfológicos de alta resolución de los tejidos objetivo. Estas imágenes se extraen para crear una computadora para la bioimpresión que la impresora entiende [9].

En la etapa de procesamiento, los bloques celulares se fabrican con el uso de máquinas de bioimpresión que pueden emplear inyección de tinta, láser y extrusión. Normalmente, los movimientos de los cabezales son controlados por una plataforma mecánica de tres ejes que imprime los biomateriales basados en los modelos tisulares 3D diseñados [2].

Durante el posprocesamiento tiene lugar la maduración de las construcciones celulares, es un paso crucial para la estimulación de crecimiento del tejido deseado. La viabilidad del tejido resultante requiere de un suministro adecuado de nutrientes y oxígeno, y la eliminación efectiva de productos de desecho. Además, las señales químicas y mecánicas también tienen un papel crítico en el control del comportamiento celular y el desarrollo tisular. Los factores de crecimiento y diferenciación, que se seleccionan y aplican selectivamente, actúan sobre los

receptores celulares específicos y activan respuestas celulares específicas que son responsables de la división, la síntesis de la matriz y la diferenciación [1][4].

La necesidad de estimulación mecánica in vitro en ingeniería de tejidos surge del hecho de que la mayoría de los tejidos operan bajo condiciones biomecánicas particulares in vivo. Estas condiciones son estímulos cruciales para la regeneración y remodelación de tejidos. Sin embargo, bajo condiciones in vivo, los constructos de células 3D a menudo carecen de señales de fluidos mecánicas durante la formación. Una de las formas en que se tratan estas necesidades es con la ayuda de avanzados sistemas de cultivo de células in vitro, como los biorreactores. Los biorreactores, además de ser capaces de regular y controlar factores como el pH, la temperatura, la tensión de oxígeno y la perfusión de las células, también pueden operar para proporcionar estímulos externos, de manera que puedan considerarse que incluyen el estrés de cizallamiento y las fuerzas mecánicas. Estos sistemas son muy importantes para el desarrollo in vitro de los andamios celulares 3D después del proceso de bioimpresión [2][9].

### **3.3. Biotintas.**

La vía principal de la impresión 3D son las biotintas, compuestas por mezclas variadas y versátiles de uno o más materiales hidrogel, aditivos y células. Se pueden formar a partir de materiales sintéticos o naturales que se entrecruzan tras la impresión para crear una estructura estable [5].

Las biotintas se pueden clasificar en dos grandes grupos: las biocompatibles, empleadas principalmente en aplicaciones médicas, y las no biocompatibles, que se utilizan mayormente en sectores industriales. En el ámbito biomédico, las biotintas biocompatibles juegan un papel fundamental, ya que su interacción con los tejidos vivos es crucial para permitir una integración adecuada sin provocar reacciones adversas [10].

En cuanto a los materiales utilizados en las biotintas, los polímeros empleados pueden dividirse en naturales y sintéticos. Los polímeros naturales, como el colágeno, la gelatina y el ácido hialurónico, se utilizan ampliamente debido a su biocompatibilidad y capacidad para imitar la matriz extracelular. Estos materiales tienen la ventaja de interactuar eficazmente con las células, lo que facilita tanto la

adhesión como la proliferación celular. No obstante, presentan limitaciones a la hora de ajustar sus propiedades mecánicas, lo que puede ser un inconveniente en aplicaciones que requieren una alta resistencia estructural [5].

Por otro lado, los polímeros sintéticos, como el polietilenglicol (PEG) y el polilactato (PLA), se han diseñado para ofrecer propiedades mecánicas específicas y una degradación controlada. Estos polímeros permiten un mayor control sobre parámetros clave como la viscosidad, la rigidez y la velocidad de degradación, haciéndolos ideales para la impresión de estructuras que deben mantener su forma bajo presión. Sin embargo, aunque los polímeros sintéticos ofrecen ventajas en términos de control mecánico, su biocompatibilidad puede ser inferior a la de los polímeros naturales, lo que a menudo requiere modificaciones químicas adicionales para mejorar su integración con las células [2] [5].

Los hidrogeles, otro componente esencial de las biotintas, se han convertido en uno de los tipos más utilizados para la fabricación de *scaffolds* debido a su notable capacidad para retener grandes cantidades de agua, creando un entorno húmedo similar al de los tejidos biológicos. Su naturaleza hidrofílica permite un intercambio adecuado de nutrientes y desechos, lo cual es crucial para mantener la viabilidad celular durante y después del proceso de impresión. Además, los hidrogeles ofrecen la posibilidad de ajustar sus propiedades, como rigidez y elasticidad, según la aplicación específica, lo que los hace sumamente versátiles para distintos tipos de tejidos [10].

Hidrogeles como el alginato, el colágeno y la gelatina metacrilada son ampliamente utilizados gracias a su capacidad para formar redes tridimensionales que promueven tanto la adhesión celular como el transporte de moléculas bioactivas. El alginato, por ejemplo, se entrecruza fácilmente mediante gelificación iónica, mientras que la gelatina metacrilada puede fotopolimerizarse, permitiendo un control preciso sobre el momento y el lugar de la gelificación [11]. Además de ser funcionalizables, los hidrogeles pueden incorporar nanopartículas u otros aditivos para mejorar sus propiedades mecánicas, haciéndolos más resistentes a la compresión y manteniendo su estabilidad estructural durante períodos más largos [2].

En cuanto a los factores bioactivos incluidos en las biotintas, estos juegan un papel crucial en guiar el crecimiento y la diferenciación celular. La bioimpresión permite integrar directamente estos factores, como proteínas y moléculas señalizadoras, en las estructuras impresas, facilitando la creación de un entorno biomimético para las células. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) se utilizan frecuentemente para estimular la proliferación y diferenciación celular, dirigiendo el comportamiento de las células hacia funciones específicas dentro del tejido impreso [10]. Estos factores también pueden modular el microambiente celular, promoviendo la formación de nuevos vasos sanguíneos, un aspecto esencial para desarrollar tejidos complejos como hueso y cartílago [11]. Asimismo, los factores bioactivos son clave para asegurar que las células sobrevivan al proceso de impresión y continúen proliferando y formando la matriz extracelular necesaria para el mantenimiento y la reparación de los tejidos [10].

La adecuada selección de la biotinta, que incluye polímeros, hidrogeles y factores bioactivos, no solo debe cumplir con los requisitos de biocompatibilidad, sino que también debe adaptarse a las condiciones específicas del tejido que se desea replicar. Esto implica considerar no solo la viscosidad y capacidad de impresión de la biotinta, sino también su capacidad para formar estructuras tridimensionales que mantengan su integridad mecánica y funcionalidad biológica a lo largo del tiempo [1] [4].

### **3.4. Biomateriales.**

El uso de biomateriales ha sido crucial en la investigación para el tratamiento de tejido óseo. Para su desarrollo, tanto de biomateriales naturales como sintéticos, es crucial conocer los distintos factores biológicos y químicos que facilitan el proceso de regeneración. [7] Además es muy importante que estos biomateriales presenten ciertas características como que deben ser no tóxicos, biocompatibles y poseer propiedades osteoconductoras y biomecánicas [7] [15].

### **3.4.1. Hidroxiapatita.**

La hidroxiapatita (HAp) es uno de los componentes principales del hueso, llega a un 70% de su composición [16]. La HA es el más estable de los biomateriales de la familia de fosfato de calcio, su excepcional biocompatibilidad y bioactividad es lo que más llamó la atención a los investigadores [17]. Por esto es uno de los materiales más usado en la ingeniería de tejido óseo [7] [15].

La HAp sintética es un material cerámico compuesto en su mayoría de fosfato de calcio, su fórmula química y propiedades son similares a la parte inorgánica de los huesos y dientes [16]. Posee una estructura porosa que permite la infiltración celular, el transporte de nutrientes y la formación de nuevo tejido. Esto se debe a que puede imitar la matriz extracelular del tejido óseo y de esta manera facilita la unión celular, proliferación y diferenciación. A pesar de las buenas propiedades que posee, existen también deficiencias mecánicas como la baja resistencia a la tracción o compresión, por esta razón en los últimos años se ha estado trabajando en materiales híbridos para mejorar sus características [18].

### **3.4.2. Recombinámeros de tipo elastina**

La elastina es una de las proteínas mayoritarias de la matriz extracelular en los mamíferos. Su principal propiedad es aportar elasticidad a los tejidos, pero gracias a su secuencia de aminoácidos también es capaz de regular la adhesión o proliferación, o las características y composición de la matriz celular [19].

La elastina tiene la capacidad única de recuperarse tras miles de deformaciones sin perder sus propiedades mecánicas. Esta proteína se produce principalmente en las primeras etapas de desarrollo o cuando el tejido es dañado, con muy poca secreción en adultos, lo que demuestra su estabilidad y durabilidad [20].

Los ELRs son polímeros proteicos obtenidos mediante técnicas recombinantes. Su secuencia está basada en la de la elastina natural que contiene motivos que se repiten como: VPGVG, IPGVG, VPGG, VGVAPG. La composición de aminoácidos de los ELRs obtenidos está totalmente controlada, se basa en la repetición de 5 aminoácidos: VPGXG, donde la X se corresponde con cualquier aminoácido natural excepto la prolina, que determina las propiedades fisicoquímicas del ELR [21].

| <b>Aminoácido</b> | <b>Abreviatura (3 letras)</b> | <b>Abreviatura (1 letra)</b> |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Alanina           | Ala                           | A                            |
| Arginina          | Arg                           | R                            |
| Asparagina        | Asn                           | N                            |
| Acido aspártico   | Asp                           | D                            |
| Cisteína          | Cys                           | C                            |
| Acido glutámico   | Glu                           | E                            |
| Glutamina         | Gln                           | Q                            |
| Glicina           | Gly                           | G                            |
| Histidina         | His                           | H                            |
| Isoleucina        | Ile                           | I                            |
| Leucina           | Leu                           | L                            |
| Lisina            | Lys                           | K                            |
| Metionina         | Met                           | M                            |
| Fenilalanina      | Phe                           | F                            |
| Prolina           | Pro                           | P                            |
| Serina            | Ser                           | S                            |
| Treonina          | Thr                           | T                            |
| Triptófano        | Trp                           | W                            |
| Tirosina          | Tyr                           | Y                            |
| Valina            | Val                           | V                            |

*Tabla 1. Código de aminoácidos*

Una característica crucial de los ELRs, que los distingue de otros polímeros, es su comportamiento termosensible, conocido como Temperatura de Transición Inversa (TTI). A diferencia de la mayoría de los polímeros, cuya solubilidad tiende a aumentar con la temperatura, los ELRs presentan una temperatura de transición (Tt), por debajo de la cual el polímero permanece soluble en agua, formando soluciones líquidas y transparentes [22]. Este fenómeno ocurre debido a la formación de clatratos de agua alrededor de las cadenas laterales apolares de los aminoácidos, lo que mantiene las cadenas poliméricas en un estado extendido y desordenado [23]. Sin embargo, cuando la temperatura supera la Tt, los clatratos se rompen, lo que provoca que la cadena del ELR se pliegue en una estructura espiral  $\beta$ , expulsando el agua y facilitando la formación de agregados estables mediante interacciones hidrofóbicas [24].

Este comportamiento de transición inversa resulta esencial en aplicaciones biomédicas, ya que permite utilizar los ELRs en condiciones controladas de

temperatura para formar hidrogeles u otras estructuras funcionales. La Tt de los ELRs está influenciada por diversos factores, como la secuencia de aminoácidos (especialmente el tipo de aminoácido en la posición Xaa), la concentración de sales, el pH y la polaridad del polímero. Aminoácidos más polares en la posición Xaa tienden a aumentar la Tt, lo que proporciona un alto grado de control sobre el comportamiento térmico del polímero [25].

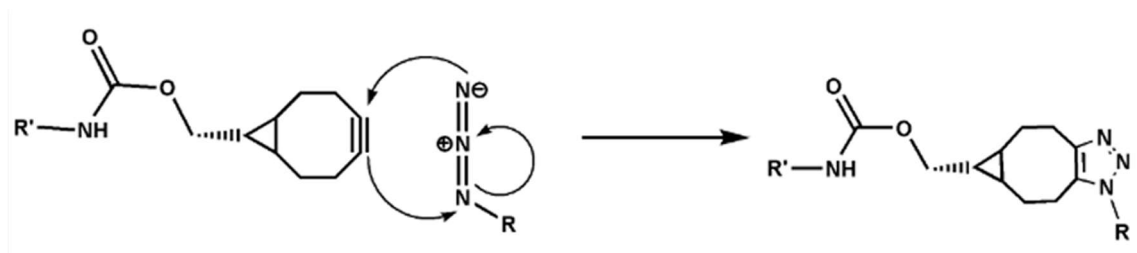
En investigaciones actuales se han conseguido hidrogeles formados con estos ELRs que poseen secuencias específicas para facilitar la adhesión celular mediada por integrinas y otras secuencias sensibles a la elastasa, permitiendo estudiar la biodegradación de los ELRs. Se demostró que estos hidrogeles podían estimular la proliferación de osteoblastos y ayudar a las células huésped a migrar al andamio, mejorando así la viabilidad celular. Además, la biodegradación del andamio ocurrió simultáneamente con la regeneración ósea, reafirmando que la remodelación ósea del hueso es la que determina la degradación del *scaffold*. [26]

El uso de materiales con componentes poliméricos y cerámicos nos proporciona unas propiedades únicas. Los materiales tienen bioactividad y resistencia mecánica de la cerámica, pero al mismo tiempo, biodegradabilidad, resistencia y flexibilidad de los polímeros. La hidroxiapatita y los polímeros en la impresión 3D han tenido éxito en la regeneración ósea [16].

### **3.4.3. Metodología "Click" en la Creación de Biotintas**

La metodología "click" se destaca por su capacidad para formar enlaces covalentes específicos y estables entre los componentes de las biotintas, como los recombinámeros tipo elastina y la hidroxiapatita. Esta técnica, que utiliza una reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre un grupo azida y un grupo alquino, da lugar a la creación de un enlace triazol. Al no requerir catalizadores metálicos, es altamente adecuada para aplicaciones biomédicas [12-14].

En la fabricación de biotintas, la metodología "click" permite la funcionalización precisa de los biomateriales, lo que mejora la estabilidad y durabilidad de los scaffolds impresos. Además, su alta selectividad y eficiencia son cruciales para mantener intactas las propiedades mecánicas y bioactivas de la biotinta tanto durante como después del proceso de impresión [12-14].



*Figura 1. Reacción click entre un grupo azida y un alquino*

## 4. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es el inicio del desarrollo de una biotinta con hidroxiapatita y ELRs para regeneración ósea, para ello se han planteado los siguientes objetivos secundarios:

- Síntesis de los ELRs, VKV-ciclooctino, VKV-N<sub>3</sub> y HRGD-N<sub>3</sub>.
- Caracterización física de los ELRs sintetizados.
- Desarrollo de hidrogeles mediante la combinación de los ELRs sintetizados y la hidroxiapatita utilizando la metodología "click".
- Evaluación de las propiedades reológicas de los geles utilizando un reómetro, determinando la viscosidad, elasticidad, y comportamiento bajo esfuerzo.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. ELRs Utilizados

En esta investigación, se utilizaron tres tipos de ELRs: VKV-ciclooctino, VKV-N3 y HRGD-N3, sintetizados mediante técnicas recombinantes en el laboratorio del grupo de investigación Bioforge. Estos ELRs son fundamentales para la formación de hidrogeles debido a su capacidad para formar redes tridimensionales mediante la reacción "click", esencial para la bioimpresión 3D.

El HRGD integra la secuencia de adhesión celular RGD, esencial para la biofuncionalidad de los *scaffolds*. La secuencia de aminoácidos de este ELR es: MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP[(VPGIG)<sub>2</sub>(VPGKG)(VPGIG)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> AVTGRGDSPASS[(VPGIG)<sub>2</sub>(VPGKG)(VPGIG)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>.

Por otro lado, el VKV tiene una estructura similar, pero sin la secuencia bioactiva, lo que lo hace útil para comparar el efecto de la funcionalización específica en las propiedades del gel. Su estructura peptídica es: MESLLP VG VPGVG [VPGKG(VPGVG)<sub>5</sub>]<sub>23</sub> VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGV.

### 5.2. Otros reactivos

En el desarrollo de esta investigación, se utilizaron los siguientes reactivos:

| Reactivo                                                               | Proveedor                   |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 2-(Azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato                     | Galchimia                   |
| (1R, 8S, 9S)-biciclo (6.1.0.) non-4-yn-9- ilmetil succidimil carbonato | Galchimia                   |
| 11-azidoundeciltriétoxisilano                                          | Galchimia                   |
| DMSO                                                                   | Sigma-Aldrich               |
| Etanol                                                                 | Scharlau                    |
| Agua destilada                                                         | BioForge                    |
| Agua ultrapura (miliQ)                                                 | BioForge                    |
| Dietil éter                                                            | Thermo Scientific Chemicals |
| Dimetilformamida                                                       | Scharlau                    |
| Diclorometano                                                          | Sigma-Aldrich               |
| Sulfato de cobre                                                       | Fluka                       |
| Hidroxiapatita                                                         | Sigma-Aldrich               |

Tabla 2. Reactivos utilizados en la investigación.

### 5.3. Equipamiento utilizado

En la Tabla 3, podemos ver todos los aparatos utilizados a lo largo de los experimentos realizados para el TFG.

| Aparato                      | Casa comercial               |
|------------------------------|------------------------------|
| Agitador termomagnético      | IKA                          |
| Balanza de precisión         | Mettler Toledo               |
| Campana de flujo laminar     | Telstar                      |
| Centrífuga                   | Thermo Scientific            |
| DSC Mettler Toledo 822e      | Mettler Toledo               |
| Espectrofotómetro FTIR       | Bruker Tensor 27             |
| Espectrómetro automático RMN | Agilent Technologies NMR 400 |
| Estufa                       | Memmert                      |
| Reómetro AR-2000ex           | TA Instruments               |

*Tabla 3. Aparatos utilizados durante la experimentación*

### 5.4. Modificación de los Polímeros

En esta investigación, se llevaron a cabo modificaciones químicas en dos ELRs, específicamente VKV y HRGD, con el propósito de añadir grupos funcionales que facilitaran su participación en la reacción "click". Para ello, se llevaron a cabo tres tipos de modificaciones: la introducción de ciclooctino en el ELR VKV, de azida en el ELR VKV y de azida en el ELR HRGD.

#### 5.4.1. Modificación del ELR VKV con ciclooctino y HRGD con azida

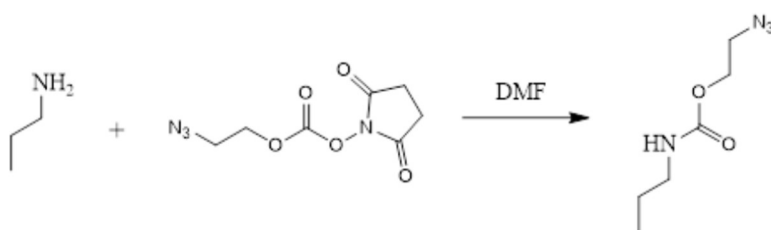
Para modificar el VKV, se emplearon 0.18 g de ciclooctino (equivalentes a 0.42 mmol, 0.6 eq), disueltos en 1 ml de dimetilformamida (DMF). Esta solución se añadió a una disolución de 2.6 g de VKVx14 (conteniendo 0.692 mmol de grupos NH<sub>2</sub>, 24 lisinas, 0.6 eq, PM 60642 Da) en 50 ml de DMF.

De manera similar, la modificación del HRGD se realizó utilizando 0.141 g de azida (equivalentes a 0.42 mmol, 0.6 eq) disueltos en 1 ml de DMF, que se añadieron a una disolución de 2.6 g de HRGD, con la misma cantidad de grupos NH<sub>2</sub> y lisinas que el VKVx14, en 50 ml de DMF. Ambas mezclas se agitaron a temperatura ambiente

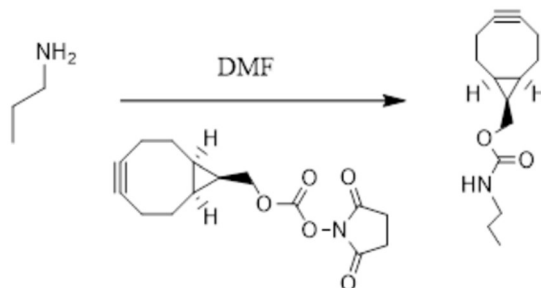
durante 24 horas, manteniendo la presión adecuada mediante un globo colocado en la parte superior del recipiente.

Finalizada la reacción, las disoluciones se distribuyeron en tres tubos Falcon de 15 ml cada uno, añadiendo 45 ml de éter dietílico a cada tubo para precipitar los polímeros modificados. Los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se lavaron los precipitados tres veces con 15 ml de acetona antes de secarlos bajo presión reducida. Los precipitados secos se disolvieron en 20 ml de agua ultrapura a 4°C y se sometieron a un proceso de diálisis utilizando membranas adecuadas. Este proceso se llevó a cabo en tres etapas: dos cambios en 25 litros de agua destilada y un tercer cambio en 25 litros de agua ultrapura, asegurando así la eliminación completa de los solventes y reactivos.

Una vez finalizada la diálisis, la solución resultante fue filtrada para eliminar cualquier impureza residual, tras lo cual se distribuyó en recipientes adecuados y se congeló a -80°C, preparando el material para la liofilización. Finalmente, las soluciones congeladas se sometieron a un proceso de liofilización para obtener los ELRs modificados, VKV-ciclooctino y HRGD-azida, que se almacenaron a temperatura controlada hasta su uso en experimentos posteriores.



*Figura 2. Esquema general de la reacción para modificar un ELR con azida.*



*Figura 3. Esquema general de la reacción para modificar un ELR con ciclooctino.*

#### **5.4.2. Modificación del ELR VKV con azida sódica**

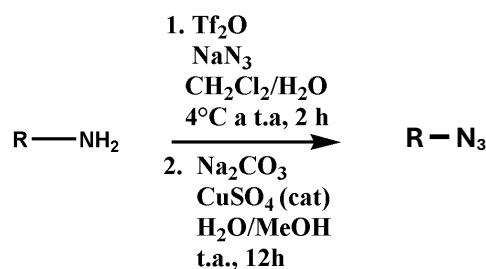
La modificación del ELR VKV mediante la introducción de grupos azida se llevó a cabo en dos etapas, utilizando azida sódica, diclorometano y trifluoruro anhidro, con sulfato de cobre como catalizador. En la primera etapa, se disolvieron 2 gramos de VKV en 24 ml de una solución fría, manteniendo la mezcla bajo agitación hasta lograr la disolución completa del polímero. Una vez disuelto el VKV, se añadió carbonato de sodio como base para facilitar las etapas posteriores de la reacción.

Simultáneamente, en una segunda disolución, se disolvieron 5 gramos de azida sódica en 14 ml de agua a temperatura ambiente. Una vez disuelta, la mezcla se enfrió y se añadió diclorometano, lo que provocó la formación de dos fases. Estas fueron agitadas vigorosamente para asegurar una mezcla adecuada. Luego, se añadió trifluoruro anhidro y la mezcla se mantuvo en frío durante una hora. Tras este tiempo, la fase orgánica (diclorometano) fue extraída y lavada con una solución saturada de carbonato de sodio para eliminar impurezas.

Tras finalizar la reacción, se utilizó un embudo de decantación para separar las fases. La fase orgánica fue colocada en un evaporador rotatorio durante 24 horas para eliminar el metanol residual y otros disolventes volátiles.

El polímero modificado se disolvió posteriormente en agua ultrapura a 4°C y se sometió a un proceso de diálisis para eliminar los restos de disolventes y reactivos. Este proceso consistió en tres etapas de diálisis: dos cambios en 25 litros de agua destilada y un tercer cambio en 25 litros de agua ultrapura. Tras la diálisis, la solución fue filtrada para eliminar cualquier impureza residual.

Finalmente, la solución purificada se distribuyó en recipientes y se congeló a -80°C. Las soluciones congeladas se sometieron luego a liofilización, obteniendo el ELR VKV modificado con grupos azida, que fue almacenado a temperatura controlada hasta su uso en experimentos posteriores.



*Figura 4. Esquema general de la reacción para modificar un ELR con azida sódica*

## 5.5. Caracterización de los polímeros

### 5.5.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

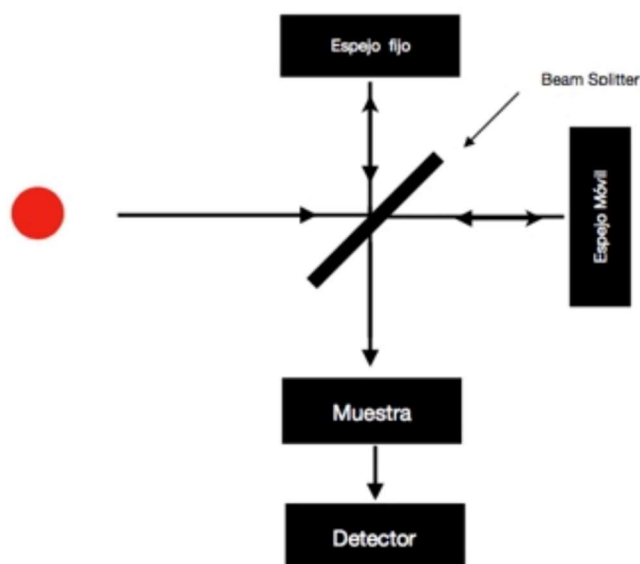
La Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica ampliamente utilizada para identificar los grupos funcionales presentes en una muestra y caracterizar los enlaces químicos que la componen. Es especialmente útil para comparar los espectros de polímeros antes y después de su modificación química, proporcionando evidencia de la incorporación de nuevos grupos funcionales [27] [28].

El principio de la FTIR se basa en la absorción de luz infrarroja por las moléculas de la muestra, lo que provoca vibraciones en los enlaces a frecuencias específicas [27] [29]. Cuando la frecuencia de la radiación infrarroja coincide con la frecuencia de vibración de un enlace particular, se produce una absorción de energía que se refleja en el espectro obtenido [30] [31]. Cada tipo de enlace químico tiene una frecuencia de vibración característica, determinada por la fuerza del enlace y la masa de los átomos implicados, lo que permite una identificación precisa de los grupos funcionales presentes en la muestra [30] [31].

El espectro resultante es único para cada sustancia, funcionando como una "huella digital" molecular. Para interpretar el espectro, se emplea un interferómetro de Michelson, que convierte la señal de interferencia en un espectro legible mediante la Transformada de Fourier. Este método permite analizar un amplio rango de frecuencias simultáneamente, acelerando el proceso de caracterización [27] [32].

En este estudio, se utilizó la técnica de FTIR-ATR (Reflexión Total Atenuada), un método rápido y no destructivo para el análisis de muestras sólidas. El espectro se obtuvo al reflejar un haz de infrarrojos a través de un cristal en contacto directo con

la muestra, lo que mejora la precisión sin necesidad de una preparación especial [30]. El equipo empleado fue un espectrómetro de infrarrojo Bruker Tensor 27, con el software OPUS para el análisis de datos. Las mediciones abarcaron un rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , permitiendo identificar los picos característicos de los grupos funcionales añadidos a los ELRs modificados, como los grupos azida y ciclooctino [32].



*Figura 5. Esquema de un espectrofotómetro FTIR con interferómetro de Michelson*

### 5.5.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una técnica termoanalítica ampliamente utilizada en la ciencia de materiales debido a su alta sensibilidad y precisión para estudiar el comportamiento térmico de las sustancias. Esta técnica permite medir la cantidad de calor absorbido o liberado por una muestra durante un proceso de calentamiento o enfriamiento controlado, proporcionando información valiosa sobre las transiciones de fase, la estabilidad térmica, la capacidad calorífica y otros procesos térmicos del material analizado [33].

El principio de funcionamiento del DSC se basa en la comparación del flujo de calor entre una muestra y una referencia, ambas sometidas al mismo programa de temperatura. La muestra y la referencia se colocan en crisoles separados, generalmente de aluminio, dentro del equipo. A medida que se aplica un programa

de calentamiento o enfriamiento, cualquier cambio en la capacidad calorífica de la muestra, como una transición de fase, provoca una diferencia en el flujo de calor entre los dos crisoles. Esta diferencia se mide y se registra como una función de la temperatura [34] [35]. El resultado se representa en una curva DSC, donde los procesos endotérmicos, en los que la muestra absorbe energía (como la fusión), aparecen como picos negativos, mientras que los procesos exotérmicos, en los que la muestra libera energía (como la cristalización), aparecen como picos positivos [36].

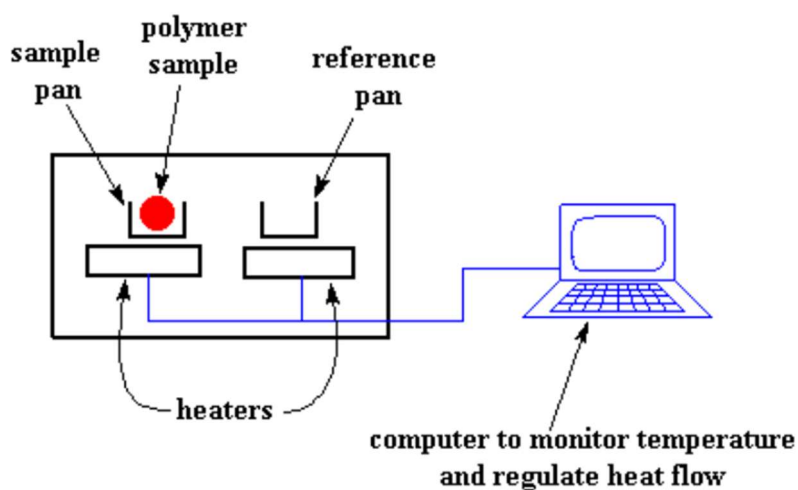
Existen dos tipos principales de calorímetros DSC: los de flujo de calor y los de compensación de potencia. En los calorímetros de flujo de calor, la muestra y la referencia se colocan en una misma celda, separadas por un puente, y la diferencia de flujo de calor entre ambas se mide directamente. En cambio, en los calorímetros de compensación de potencia, la muestra y la referencia se colocan en celdas separadas, y se mide la diferencia de temperatura entre ambas para mantenerlas a una potencia constante [35] [37]. Ambos métodos producen resultados comparables, aunque el equipo utilizado en este trabajo, un Mettler Toledo 822e, pertenece al tipo de flujo de calor y está equipado con un enfriador de nitrógeno líquido que permite trabajar en un rango de temperaturas desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta 80°C [36].

Para llevar a cabo las mediciones, se prepararon soluciones de los ELRs modificados, disolviendo 50 mg/ml del polímero en agua ultrapura. Estas soluciones se mantuvieron a 4°C para asegurar su estabilidad antes del experimento. En el momento de la medición, se depositaron 20 µl de la disolución en un crisol de aluminio, y la misma cantidad de agua ultrapura se colocó en un crisol de referencia. Para asegurar la precisión de las mediciones, se utilizó una balanza de alta precisión para igualar las masas de las muestras y las referencias.

El experimento de DSC siguió un programa que comenzó con una fase de estabilización isotérmica a 0°C durante 5 minutos, seguida de un calentamiento a una tasa de 4°C por minuto hasta alcanzar 20°C. Las curvas resultantes mostraron los picos endotérmicos que indican la temperatura de transición inversa de los polímeros. Estos picos se analizaron para determinar la temperatura exacta de

transición térmica, calculada como la media de las mediciones repetidas para asegurar la precisión de los resultados.

Además de la temperatura de transición, la curva DSC permite calcular la entalpía del proceso integrando el área bajo el pico, lo que proporciona información sobre la energía involucrada en las transiciones de fase [36]. Este tipo de análisis es crucial para entender cómo las modificaciones químicas afectan la estabilidad térmica y las propiedades físicas de los ELRs, aportando datos esenciales para su aplicación en biotintas y otros usos biomédicos.



*Figura 6. Esquema Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)*

### 5.5.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética (RMN)

La Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica esencial para la caracterización de la estructura molecular de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Su utilidad radica en la capacidad de estudiar el entorno químico de los núcleos atómicos dentro de una molécula al observar su comportamiento en presencia de un campo magnético externo. En el contexto de polímeros como los ELRs, la RMN resulta particularmente valiosa para determinar la estructura y la pureza, proporcionando información detallada sobre la disposición y composición atómica de la molécula [38] [39].

El principio de la RMN se fundamenta en la capacidad de ciertos núcleos atómicos, como el hidrógeno-1 ( $^1\text{H}$ ), el carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), el flúor-19 ( $^{19}\text{F}$ ) y el fósforo-31 ( $^{31}\text{P}$ ), para comportarse como diminutos imanes debido a su momento magnético. En

ausencia de un campo magnético, los espines nucleares de estos núcleos están orientados aleatoriamente. Sin embargo, al aplicar un campo magnético externo, estos espines se alinean con o en contra del campo. Los núcleos en un estado de menor energía (alineados con el campo) pueden ser excitados a un estado de mayor energía al absorber radiación electromagnética a una frecuencia específica, conocida como frecuencia de resonancia. La diferencia de energía entre estos estados depende de la intensidad del campo magnético aplicado. Cuando los núcleos excitados regresan a su estado original, emiten una señal que se registra en el espectro de RMN [40] [41].

El espectro de RMN proporciona información clave sobre la intensidad, forma y posición de las señales, que son características de los entornos químicos de los núcleos en la molécula. Por ejemplo, los núcleos de hidrógeno están rodeados de electrones que generan un campo magnético inducido opuesto al campo magnético externo, en un fenómeno conocido como apantallamiento o diamagnetismo. Este apantallamiento provoca que los protones en diferentes entornos electrónicos dentro de una molécula resuenen a frecuencias distintas, manifestándose en el espectro como desplazamientos químicos únicos [42] [43]. El desplazamiento químico es una medida relativa que indica cómo el entorno electrónico modifica la frecuencia de resonancia de un núcleo específico en comparación con una referencia estándar, comúnmente el tetrametilsilano (TMS) [43].

En este estudio, se empleó la RMN para caracterizar estructuralmente los ELRs modificados y cuantificar el rendimiento de las modificaciones químicas. Las muestras se prepararon disolviendo 6 mg del polímero en 0,6 ml de DMSO deuterado, un solvente frecuentemente utilizado en RMN por su baja absorbancia en la región de interés y su efectividad para disolver polímeros [40]. Los análisis se realizaron en un espectrómetro "Agilent Technologies NMR 400" del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, que permite obtener espectros de alta resolución, cruciales para identificar los grupos funcionales añadidos durante la modificación de los ELRs [38].

El análisis de los espectros se llevó a cabo con el software MestreNova, que facilita la integración de los picos observados y el cálculo del área bajo los mismos, esencial para determinar la proporción de diferentes grupos funcionales presentes en la

muestra. El software también permite comparar espectros antes y después de la modificación química, evaluando así el porcentaje de polímero modificado mediante las señales características introducidas por los grupos azida y ciclooctino [41] [43].

Particularmente, la RMN de  $^1\text{H}$  desempeñó un papel crucial en este estudio, al ofrecer una visión detallada del entorno químico de los protones en los ELRs. Los desplazamientos químicos permitieron identificar las posiciones de los grupos funcionales introducidos, mientras que la integración de los picos permitió una cuantificación precisa del grado de modificación del polímero. Este análisis es fundamental para garantizar que las modificaciones realizadas cumplen con los requisitos necesarios para la formación de biotintas y su aplicación en la ingeniería de tejidos [43].

## **5.6. Química “click” entre los polímeros modificados**

Se prepararon varios hidrogeles, con y sin hidroxiapatita variando la concentración tanto de los elastómeros como de la HAp, mediante química click sin catalizador.

Para la preparación de los geles, se disolvieron 75 mg/ml de cada ELR en agua ultrapura, asegurando una disolución completa y homogénea de las soluciones. Se elaboraron tres tipos de geles por cada concentración de hidroxiapatita dentro de este rango de concentración. Los primeros geles, utilizados como control, contenían únicamente los ELRs modificados, sin la adición de hidroxiapatita. En los siguientes grupos de geles, se incorporaron concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml de HAp a las soluciones de ELRs antes de iniciar la reacción de formación del gel. Este enfoque se diseñó para estudiar cómo varía la concentración de HA las propiedades finales del gel. Además, se prepararon geles con una concentración mayor de ELRs, disolviendo 125 mg/ml de cada uno. En estos casos, se siguió un procedimiento similar, añadiendo también 0.5, 1, 5 y 10 mg/ml de HAp antes de la reacción "click".

La reacción "click" se ejecutó mezclando las soluciones de ELRs modificados (con grupos azida y ciclooctino) en proporciones equimolares. Para garantizar una distribución uniforme de los reactivos, la mezcla se agitó suavemente y se dejó reaccionar primero a 4°C y después a temperatura ambiente. La cicloadición entre los grupos azida y ciclooctino permitió la formación de enlaces covalentes, creando una red tridimensional y, en consecuencia, la formación de los geles. En aquellos

geles donde se había añadido HAp, este componente se integró en la matriz del gel, lo que se espera que influya en las propiedades mecánicas y bioactivas del material resultante.

El proceso de gelificación se monitoreó tanto visualmente como mediante pruebas táctiles, determinando el punto en el que se alcanzaba la consistencia adecuada de gel. La formación completa del gel generalmente ocurrió en un corto periodo, variable según la concentración de ELRs y la presencia de HAp. Una vez formados, los geles se almacenaron a 37°C en la estufa hasta su posterior caracterización y análisis.

## 5.7. Reología

La reología es una herramienta esencial para estudiar las propiedades viscoelásticas de los geles formados mediante tecnología "click". Estos análisis son fundamentales para comprender cómo las diferentes concentraciones de ELRs y la adición de HAp influyen en las propiedades mecánicas de los geles, un aspecto crucial para su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos.

Para los experimentos reológicos, se utilizó un reómetro de control de esfuerzo AR-2000ex (TA Instruments), equipado con una geometría de placa paralela y un accesorio Peltier que permitió controlar y mantener la temperatura de las muestras. Las mediciones se enfocaron en evaluar la evolución de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en función de la deformación y la frecuencia.

Las muestras se colocaron entre las placas paralelas del reómetro a 4°C, asegurando un gap en torno a 1000  $\mu\text{m}$  para mantener la uniformidad en las mediciones. Se realizaron dos tipos principales de análisis reológicos:

En el *barrido de deformación* se mantuvo una frecuencia fija mientras se variaba la deformación aplicada, lo que permitió determinar los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) en función de la deformación. Este análisis fue clave para identificar el límite lineal viscoelástico (LVE) del gel, el cual define el rango de deformación en el que el material mantiene un comportamiento elástico [44].

Por otro lado, el *barrido de frecuencia* se llevó a cabo manteniendo una deformación fija para evaluar cómo los módulos  $G'$  y  $G''$  cambian con la frecuencia de oscilación.

Este tipo de análisis es fundamental para comprender la respuesta del gel bajo diferentes condiciones de estrés mecánico, proporcionando información sobre su comportamiento viscoelástico en diversas escalas de tiempo [44].

Las pruebas se realizaron a 37°C para simular condiciones fisiológicas. Estas mediciones permitieron caracterizar la rigidez del gel y su capacidad para resistir la deformación bajo diferentes condiciones experimentales.

En este estudio, se analizaron varios parámetros reológicos clave para caracterizar el comportamiento viscoelástico de los geles. El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) representó la energía almacenada elásticamente en el material durante la deformación. Un valor más alto de  $G'$  indica un material más rígido y elástico, lo cual es deseable en aplicaciones donde se requiere estabilidad estructural [45].

El módulo de pérdida ( $G''$ ), por su parte, representó la energía disipada como calor durante la deformación, siendo un parámetro esencial para entender la viscosidad interna del material y su capacidad para disipar energía bajo esfuerzo [46]. El módulo complejo ( $|G^*|$ ) combinó  $G'$  y  $G''$ , proporcionando una visión general de la rigidez total del material, considerando tanto la elasticidad como la viscosidad [47].

Finalmente, la tangente de delta ( $\tan \delta$ ), que es la relación entre  $G''$  y  $G'$ , proporcionó información sobre la dominancia relativa de las propiedades viscoelásticas del material. Un valor de  $\tan \delta$  menor que 1 indicó un comportamiento más elástico, mientras que un valor mayor que 1 señaló un comportamiento más viscoso [48].

El análisis de estos parámetros permitió clasificar los geles en términos de su comportamiento reológico bajo diferentes condiciones, lo cual es crucial para su diseño y aplicación en ingeniería de tejidos [39].

## **6. Resultados y discusión.**

En este apartado se analizan los resultados obtenidos mediante diversas técnicas, con el fin de evaluar si se han cumplido los objetivos planteados en este trabajo. Primero, se aborda la caracterización de los polímeros modificados, VKV-azida, VKV-ciclooctino y HRGD-azida, utilizando técnicas como FTIR, DSC y RMN. Estos análisis permitirán confirmar la incorporación de los grupos funcionales específicos en las estructuras poliméricas y evaluar sus propiedades térmicas y estructurales.

A continuación, se presentan los resultados de la formación de hidrogeles a través de la tecnología click, junto con la evaluación de sus propiedades mecánicas mediante reología.

### **6.1. Caracterización de polímeros.**

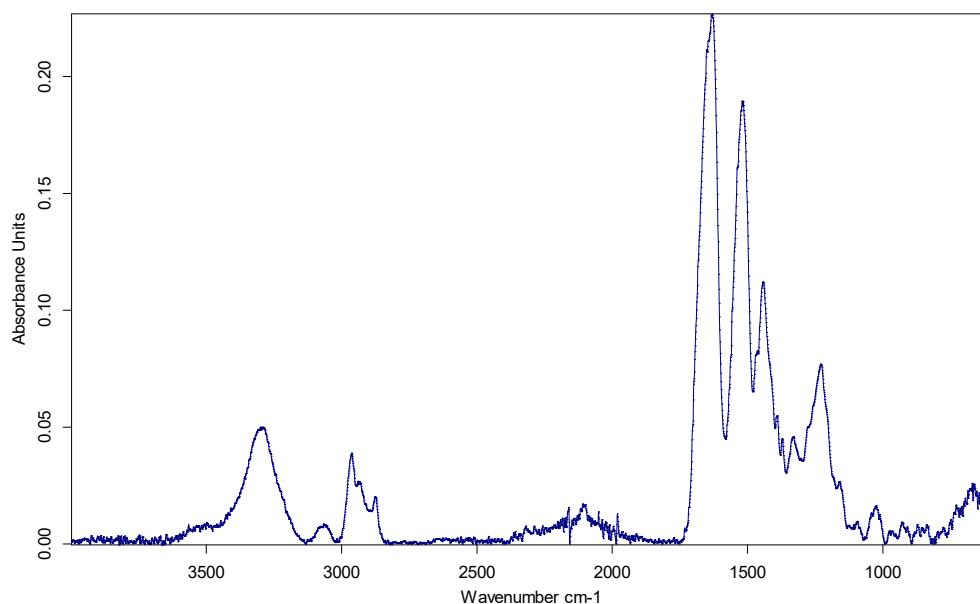
Los polímeros utilizados en este proyecto fueron específicamente modificados por mí para este TFG. Su caracterización se llevó a cabo mediante técnicas como FTIR, DSC y RMN, con el objetivo de confirmar las modificaciones químicas introducidas.

#### **6.1.1. Espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)**

Se utilizó la FTIR para obtener el espectro del polímero modificado. Este espectro fue comparado con el del polímero original, sin modificar, con el fin de verificar la correcta incorporación del grupo funcional deseado.

##### **VKV-Azida**

El espectro FTIR correspondiente al polímero VKV modificado con un grupo azida se muestra en la siguiente figura:

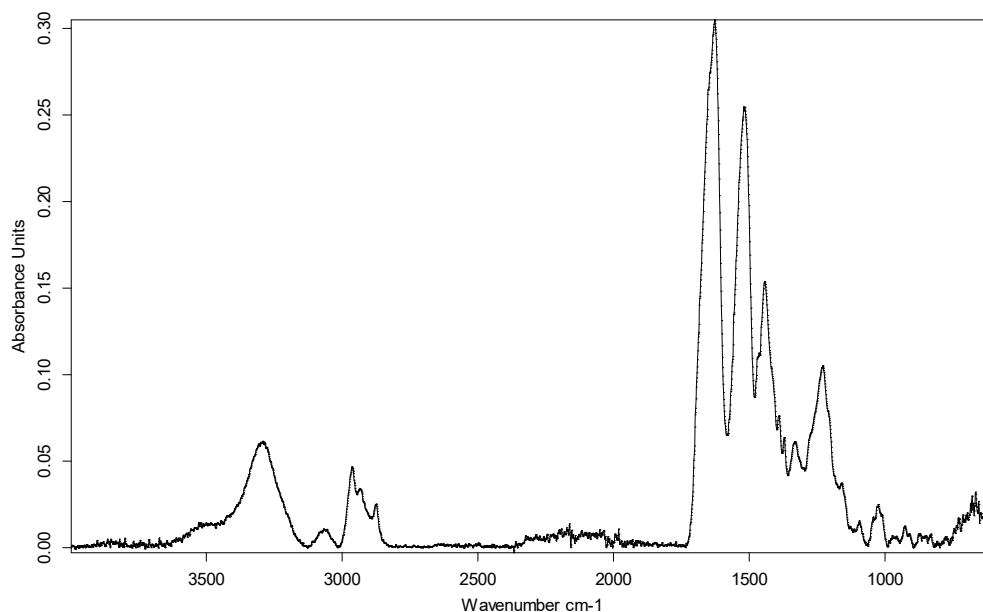


*Figura 7. Espectro FTIR de VKV-N<sub>3</sub>*

La principal característica que se buscaba identificar en este espectro era la banda de absorción correspondiente al grupo azida (N<sub>3</sub>), ubicada típicamente en la región de 2100-2200 cm<sup>-1</sup>. El espectro obtenido muestra un pico notable en esta área, confirmando que el grupo azida ha sido incorporado exitosamente en la estructura del polímero VKV. Al comparar este espectro con el del polímero VKV sin modificar, se observa la aparición de este nuevo pico, lo que indica que la modificación química se realizó de manera efectiva [49].

### **VKV-Ciclooctino**

El espectro FTIR del polímero VKV modificado con un grupo ciclooctino se presenta en la siguiente figura:

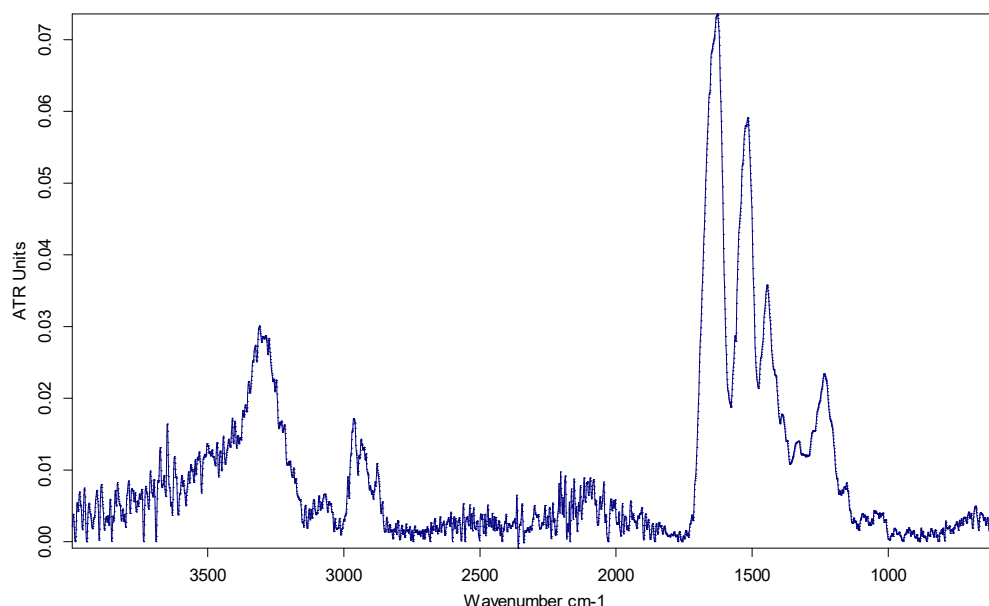


*Figura 8. Espectro FTIR de VKV-ciclooctino*

La interpretación de este espectro es más compleja debido a la simetría del anillo de ciclooctino, que provoca la cancelación de las vibraciones del triple enlace de carbono en la región de  $2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ . Como resultado, no se observan diferencias significativas al compararlo con el espectro del VKV sin modificar. Debido a estas limitaciones inherentes a la técnica FTIR para esta modificación específica, se decidió complementar la caracterización con técnicas adicionales, como la RMN, que se describirán más adelante [49].

### **HRGD-Azida**

El espectro FTIR correspondiente al polímero HRGD modificado con un grupo azida se muestra en la siguiente figura:



*Figura 9. Espectro FTIR de HRGD-N<sub>3</sub>*

De manera similar al caso de VKV-azida, se esperaba identificar una banda en la región de  $2100\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del grupo N<sub>3</sub>. El espectro muestra un pico en esta región, pero existe mucho ruido en ese intervalo. La comparación con el espectro del polímero HRGD sin modificar también evidencia este cambio, para confirmar la modificación usamos el RMN [49].

#### **6.1.2. Cálculo de la Temperatura de Transición Inversa**

La DSC se utilizó para determinar la TTI de los polímeros modificados VKV-ciclooctino y HRGD-N<sub>3</sub>. Para determinar la TTI, se realizaron tres mediciones de DSC con las disoluciones preparadas, calculando la media de los picos de transición obtenidos, junto con su desviación estándar.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4. Para la disolución de VKV-ciclooctino, la TTI fue de  $19.89 \pm 0.20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras que para HRGD-N<sub>3</sub>, la TTI se registró en  $16.19 \pm 0.17\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En el caso de VKV-N<sub>3</sub>, la temperatura de transición inversa calculada fue de  $18.35 \pm 0.18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Como se explicó en el apartado 3.4.2, los ELRs presentan un comportamiento termosensible característico. A temperaturas inferiores a su TTI, las cadenas poliméricas permanecen extendidas. Al superar esta temperatura, las cadenas se

reordenan y pliegan, formando estructuras estables gracias a interacciones hidrofóbicas. Dado que las TTI medidas para los tres polímeros son inferiores a la temperatura fisiológica (37 °C), se confirma que los ELRs tenderán a formar agregados a dicha temperatura.

| ELR             | Temperatura de transición inversa |
|-----------------|-----------------------------------|
| HRGD-N3         | 16.18 ± 0.16 °C                   |
| VKV-ciclooctino | 19.91 ± 0.18 °C                   |
| VKV-N3          | 18.35 ± 0.18 °C                   |

*Tabla 4. Resultados de la temperatura de transición inversa.*

Los valores de TTI inferiores a la temperatura fisiológica son especialmente importantes porque indican que, bajo condiciones fisiológicas, los ELRs tenderán a formar agregados y redes estables, lo que es esencial para el éxito de los geles en aplicaciones biomédicas, como la regeneración ósea.

### 6.1.3. Cálculo del porcentaje de polímero modificado

Mediante un análisis de RMN se verificó la correcta modificación de los polímeros VKV-ciclooctino, HRGD-N<sub>3</sub>, y VKV-N<sub>3</sub>, y se determinó el porcentaje de modificación en cada caso. El espectro de cada polímero modificado se comparó con el espectro del polímero sin modificar, con el objetivo de identificar las diferencias entre ambos.

#### HRGD-N<sub>3</sub>

En la Figura 8 se muestra el espectro de RMN del HRGD-N<sub>3</sub> modificado, donde se integraron las señales para determinar cuántas lisinas fueron modificadas. Al analizar la secuencia de aminoácidos del polímero HRGD puro, se identificaron las siguientes cantidades y señales correspondientes a los grupos funcionales:

- 1356 CH<sub>3</sub> con señales alrededor de 1 ppm.
- 570 NH con señales en torno a 8 ppm.
- 382 CH<sub>2</sub> con señales entre 1.3 - 1.5 ppm.
- 827 CH<sub>2</sub> con señales entre 2.0 – 2.7 ppm.
- 1244 CH<sub>2</sub> con señales entre 3.5 – 4.5 ppm.

Al comparar este espectro con el del HRGD-N<sub>3</sub>, se observa la aparición de picos adicionales en las regiones de 7.3 ppm, 3 ppm y 4 ppm, ausentes en el espectro del

La integral del pico situado en 7.3 ppm indica que aproximadamente 13.11 de las 24 lisinas presentes en el polímero fueron modificadas, lo que representa un porcentaje de modificación del 54.63%.

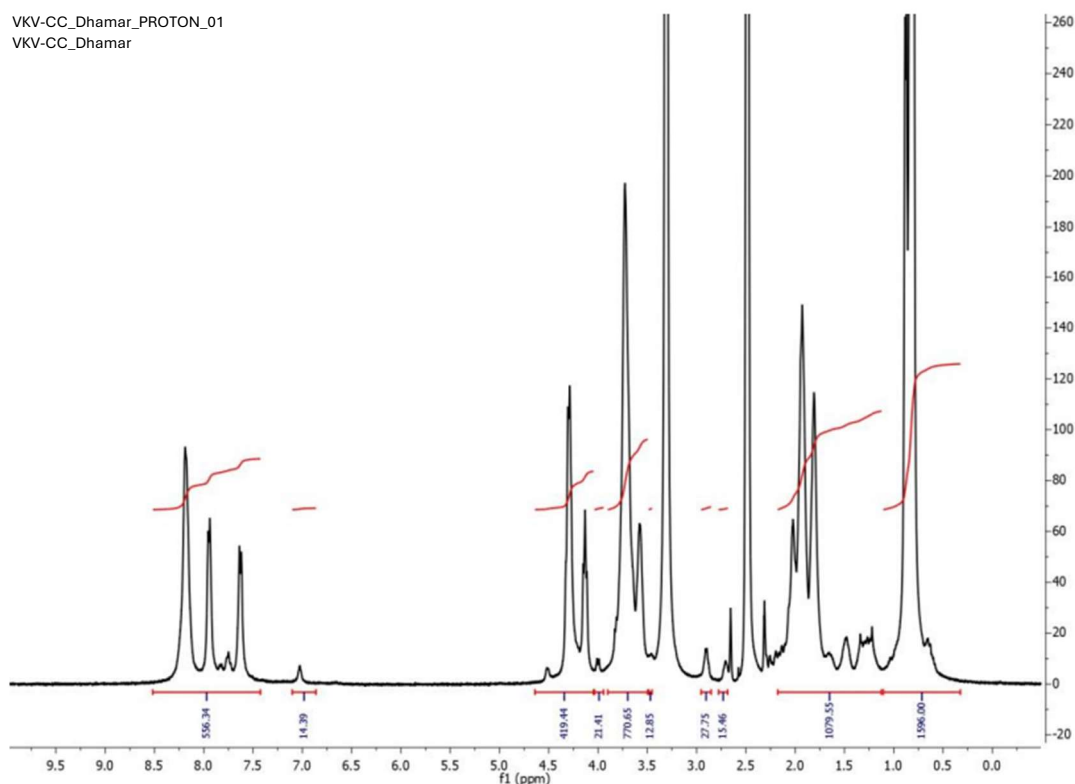


En la Figura 9 se muestra el espectro de RMN del polímero VKV-ciclooctino. La secuencia de aminoácidos del VKVx24 sin modificar revela las siguientes cantidades de grupos funcionales:

- 1596 CH<sub>3</sub> con señales alrededor de 1 ppm.
- 564.69 NH con señales en torno a 8 ppm.
- 422.7 CH con señales entre 1.7 - 1.8 ppm.
- 838.46 CH<sub>2</sub> con señales entre 2.0 – 2.7 ppm.
- 1261.15 CH<sub>2</sub> con señales entre 3.5 – 4.5 ppm.

Estableciendo la línea base de referencia en los protones del grupo  $\text{CH}_3$ , se asigna una integral de 1596. Las señales entre 1.0 – 2.7 ppm, cuya suma integra a 1079.55, corresponden aproximadamente a los protones  $\text{CH}_2$  del VKVx24 puro. En la región de 3.5 – 4.5 ppm, la suma de las integrales es 1224.35, coincidiendo con los protones  $\text{CH}_2$  teóricos en esa zona. La señal en 8 ppm corresponde a los grupos NH con una integral de 556.34.

Además, aparecen tres picos adicionales en 3, 4, y 7 ppm, que no se observan en el espectro del polímero sin modificar. Estos picos se asocian a la modificación química del polímero, con el pico a 7 ppm atribuido a la sustitución de los protones en el grupo amina de la lisina por un protón adicional unido al grupo amida. Las señales en 3 y 4 ppm indican otras modificaciones estructurales debido a la introducción de grupos ciclooctino. La integral del pico en 7 ppm sugiere que 14.39 de las 24 lisinas han sido modificadas, lo que representa un porcentaje de modificación del 59.96%.



*Figura 11. RMN de VKV-ciclooctino*

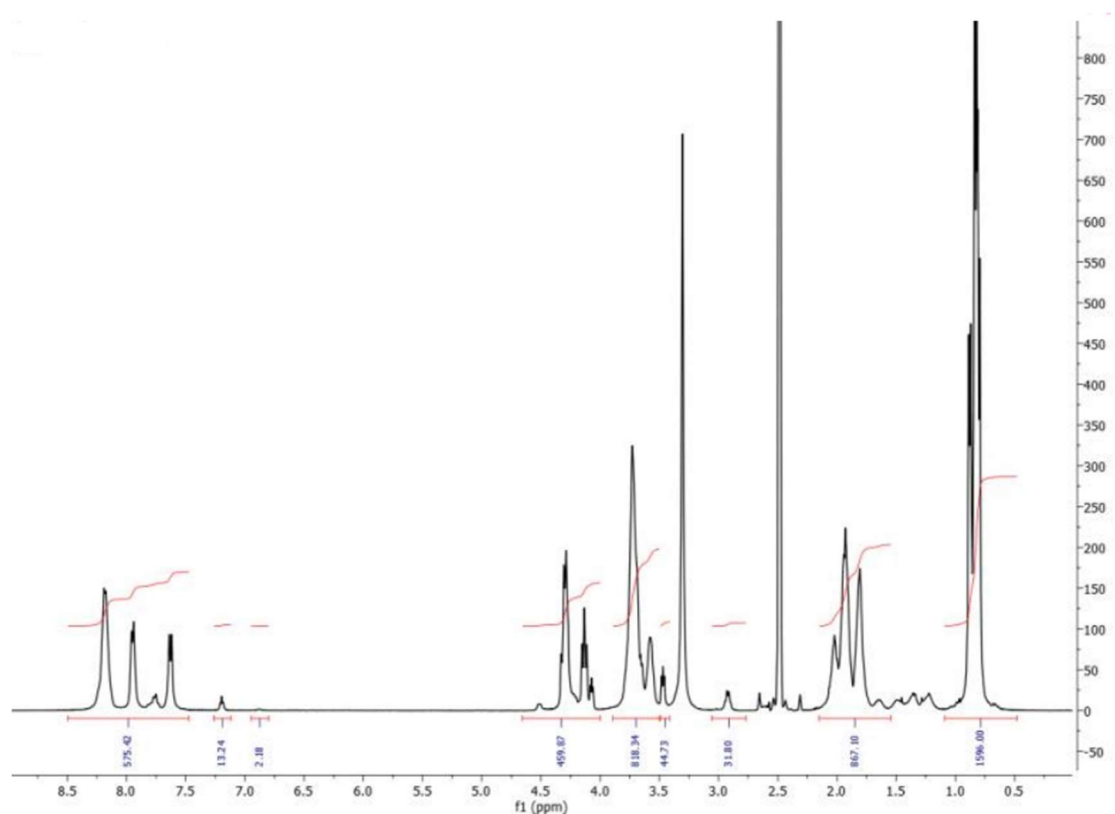
### VKV-N3

En la Figura 10 se presenta el espectro de RMN del VKV-N<sub>3</sub> modificado, donde se integraron las señales para determinar la cantidad de lisinas que fueron

modificadas. En este caso las señales y cantidades de los grupos funcionales son iguales a los del apartado anterior.

Al comparar este espectro con el del VKV sin modificar, se observan picos adicionales en las regiones de 7.3 ppm, 3 ppm y 4 ppm, que no están presentes en el espectro del polímero VKV sin modificar. Estos picos adicionales se asocian con la modificación química del polímero, específicamente debido a la introducción del grupo azida.

En particular, la integral del pico a 7.3 ppm sugiere que se han modificado aproximadamente 13.2 de las 24 lisinas presentes en el polímero, lo que corresponde a un porcentaje de modificación del 55%.



## 6.2. Formación de geles mediante química click

Al formar geles mediante la reacción química "click" entre los polímeros VKV-ciclo y HRGD-N<sub>3</sub>, y entre VKV-ciclo y VKV-N<sub>3</sub>, se observaron diferencias notables en su comportamiento tras 24 horas de hidratación en agua miliQ a 37° para simular condiciones fisiológicas. Estas diferencias se explican considerando tanto las

propiedades químicas y estructurales de los polímeros involucrados como las interacciones moleculares que ocurren durante la formación del gel.

### **Geles VKV-ciclo y HRGD-N<sub>3</sub>**

Los geles resultantes de la combinación de VKV-ciclo y HRGD-N<sub>3</sub> mostraron una hinchazón significativa y una textura blanda después de la hidratación. Este comportamiento se debe, en gran medida, a la composición de HRGD-N<sub>3</sub> que tiene una alta densidad de grupos hidrofílicos debido a la presencia de glicina, prolina y otros aminoácidos que facilitan la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua [50].

Al sumergir estos geles en agua miliQ, los grupos hidrofílicos de HRGD-N<sub>3</sub> establecen múltiples interacciones de puentes de hidrógeno, lo que provoca la absorción de grandes cantidades de agua. Esto conduce a una expansión significativa de la red polimérica, aumentando su volumen y reduciendo su densidad, lo que da lugar a una textura más blanda y menos resistente. Aunque VKV-ciclo también participa en la formación del gel, su contribución a la rigidez estructural es menor debido a la predominancia de las propiedades hidrofílicas y la flexibilidad de HRGD-N<sub>3</sub>. Así, la red resultante, a pesar de los enlaces covalentes formados entre el grupo ciclooctino de VKV-ciclo y el grupo azida de HRGD-N<sub>3</sub>, sigue siendo altamente permeable al agua, favoreciendo una estructura más suave y flexible [51].

### **Geles VKV-ciclo y VKV-N<sub>3</sub>**

Por otro lado, los geles formados por la reacción entre VKV-ciclo y VKV-N<sub>3</sub> mostraron una ligera disminución en el tamaño y una consistencia más firme tras la hidratación en agua miliQ. Este comportamiento se debe a que VKV-N<sub>3</sub>, diseñado con una estructura más homogénea y menos hidrofílica que HRGD-N<sub>3</sub>, no favorece la absorción excesiva de agua. Los grupos funcionales de VKV-N<sub>3</sub>, compuestos principalmente por secuencias de aminoácidos como valina, prolina y glicina, están configurados de manera que limitan la capacidad de hinchazón del gel.

Además, la red reticulada formada por la reacción "click" entre VKV-ciclo y VKV-N<sub>3</sub> es más densa y menos permeable, lo que restringe la absorción de agua y preserva

la forma y el tamaño del gel, resultando en una estructura más compacta y estable [42]. Esta estructura más rígida es menos propensa a deformarse, lo que la hace más adecuada para aplicaciones que requieren una mayor resistencia mecánica y estabilidad estructural.

### **Interpretación de los resultados.**

Este comportamiento diferencial es crucial en aplicaciones biomédicas, donde las propiedades mecánicas y la estabilidad estructural de los geles pueden determinar su éxito en distintas aplicaciones, como en *scaffolds* para ingeniería de tejidos o en sistemas de liberación controlada de fármacos. Los geles con HRGD-N<sub>3</sub>, más hidrofílicos, tienden a hincharse más y a ser más blandos, mientras que los geles con VKV-N<sub>3</sub> son más compactos y estables, lo que resulta en una menor hinchazón y una mayor consistencia. Estas diferencias subrayan la importancia de la composición química y la estructura molecular en la determinación de las propiedades finales de los geles.

### **6.3. Pruebas reológicas**

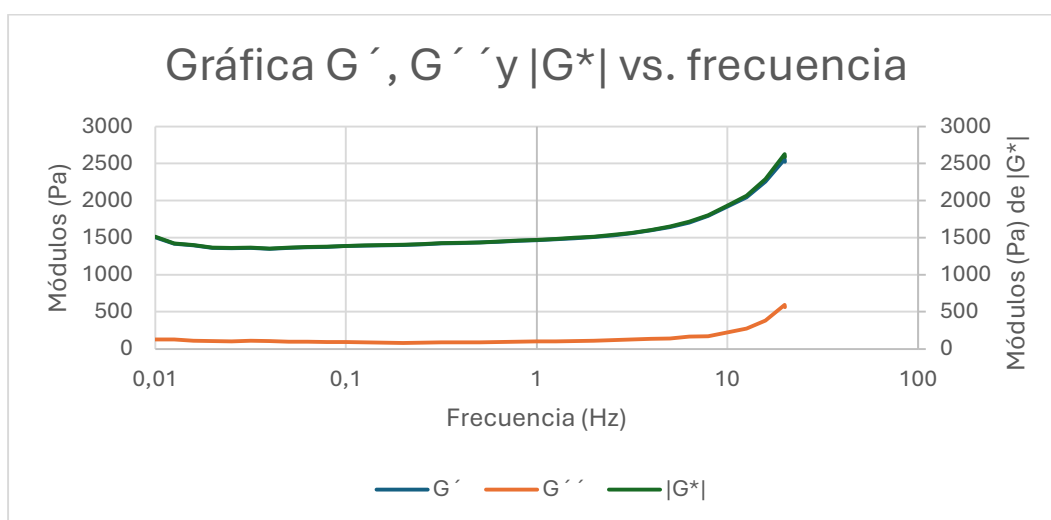
Las pruebas reológicas realizadas en este trabajo permitieron evaluar las propiedades mecánicas de los geles formados por los polímeros modificados mediante la química "click". En particular, se analizaron los módulos de almacenamiento ( $G'$ ), módulo de pérdida ( $G''$ ), el módulo complejo ( $|G^*|$ ), y el factor de pérdida ( $\tan \delta$ ), que proporcionan información crucial sobre la rigidez, elasticidad y comportamiento viscoelástico de los geles en función de la deformación (*strain*) y la frecuencia.

#### **Análisis de los módulos $G'$ , $G''$ y $|G^*|$ en función de la frecuencia**

Para este análisis, se han representado los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de HAp y con los ELR y HRGD modificados, centrándonos en los datos obtenidos a una frecuencia de 1 Hz. Esta frecuencia es especialmente

relevante para evaluar el comportamiento de los geles bajo condiciones de estrés mecánico moderado.

En una primera fase, se analizó la evolución de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) en función de la frecuencia (Figura 12), observando cómo varían ambos módulos en distintas formulaciones. Sin embargo, para obtener una visualización más clara y comparativa entre las diferentes formulaciones, se decidió representar los resultados a 1 Hz mediante gráficos de barras. Esto facilita la identificación de diferencias significativas en las propiedades mecánicas de los geles bajo estas condiciones específicas.



*Figura 12. Módulos vs. frecuencia de geles control de 75 mg/ml ELR*

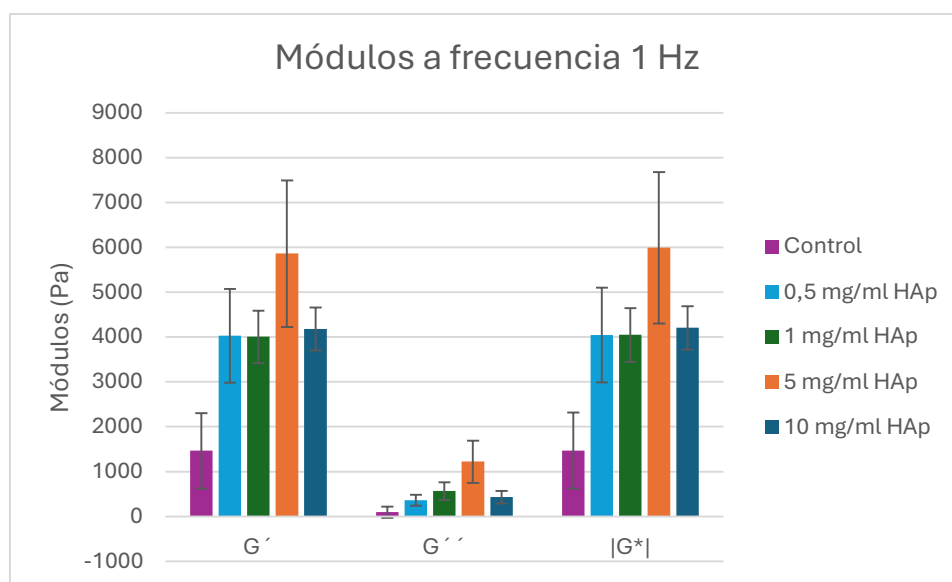
En los geles control de 75 mg/ml de ELR (Figura 13), se observa que el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) es significativamente mayor que el módulo de pérdida ( $G''$ ), lo que indica un comportamiento mayoritariamente elástico. La red polimérica entrecruzada almacena eficientemente la energía durante la deformación, lo que refleja la estabilidad estructural del gel. Esto sugiere que, a bajas concentraciones de HA, la red de ELR puede mantener una estructura robusta con una capacidad limitada para disipar energía.

La adición de 0.5 mg/ml de HAp provoca un aumento en  $G'$  y  $G''$ , lo que sugiere que la matriz polimérica se refuerza. Sin embargo, el incremento más pronunciado en  $G''$  indica que el gel comienza a comportarse de manera más viscoelástica, lo que refleja una mayor interacción entre la HAp y la matriz de ELR. La hidroxiapatita, al

introducir nuevos puntos de entrecruzamiento, aumenta la rigidez del gel, aunque también introduce heterogeneidades que favorecen la disipación de energía. Este comportamiento concuerda con estudios previos que indican que la HAp puede funcionar como refuerzo mecánico, pero también aumentar las complejidades viscoelásticas en la matriz.

A concentraciones de 5 mg/ml de HAp,  $G'$  alcanza su valor más alto, lo que indica una mayor rigidez en el gel. Esto puede deberse a la creación de una estructura más densa por la mayor cantidad de puntos de entrecruzamiento proporcionados por la HAp. Sin embargo, el aumento en  $G''$  sugiere una mayor disipación de energía, posiblemente debido a la formación de microdominios de HAp que distribuyen el estrés de manera desigual, lo que aumenta la viscoelasticidad.

Cuando la concentración de HAp llega a 10 mg/ml, los valores de  $G'$  y  $|G^*|$  disminuyen. Este comportamiento podría explicarse por la aglomeración de partículas de HAp, lo que afecta la homogeneidad de la red polimérica, comprometiendo su capacidad de almacenamiento eficiente de energía. A concentraciones tan elevadas, es probable que la HAp deje de funcionar como un refuerzo homogéneo y se convierta en un factor de inestabilidad que debilita la red.



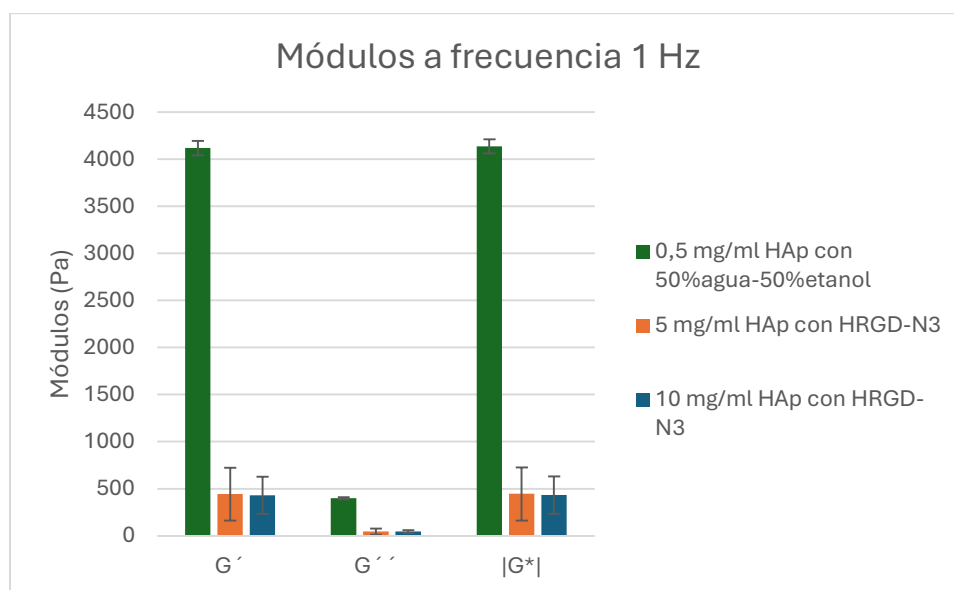
*Figura 13. Módulos a frecuencia 1 Hz de geles de 75mg/ml ERL*

Al comparar los geles que contienen VKV- $N_3$  con los de HRGD- $N_3$  (Figura 14), se observan diferencias importantes. Los geles con HRGD- $N_3$  presentan valores más

bajos de  $G'$ , lo que sugiere que la interacción entre HRGD- $N_3$  y HAp es menos eficaz para formar una red densa y entrecruzada. Esto puede estar relacionado con la estructura del propio HRGD- $N_3$ , que parece tener menos capacidad para formar interacciones fuertes con la HAp en comparación con VKV- $N_3$ .

Además, el aumento de  $G''$  en los geles con HRGD- $N_3$  indica una mayor disipación de energía durante la deformación, lo que sugiere un comportamiento más viscoelástico. Este fenómeno podría estar vinculado a una distribución menos uniforme de los puntos de entrecruzamiento, creando zonas de concentración de estrés que facilitan la disipación de energía. La mayor viscoelasticidad observada en estos geles también puede deberse a la incapacidad del HRGD- $N_3$  para mantener una estructura cohesiva y elástica a concentraciones más altas de HAp.

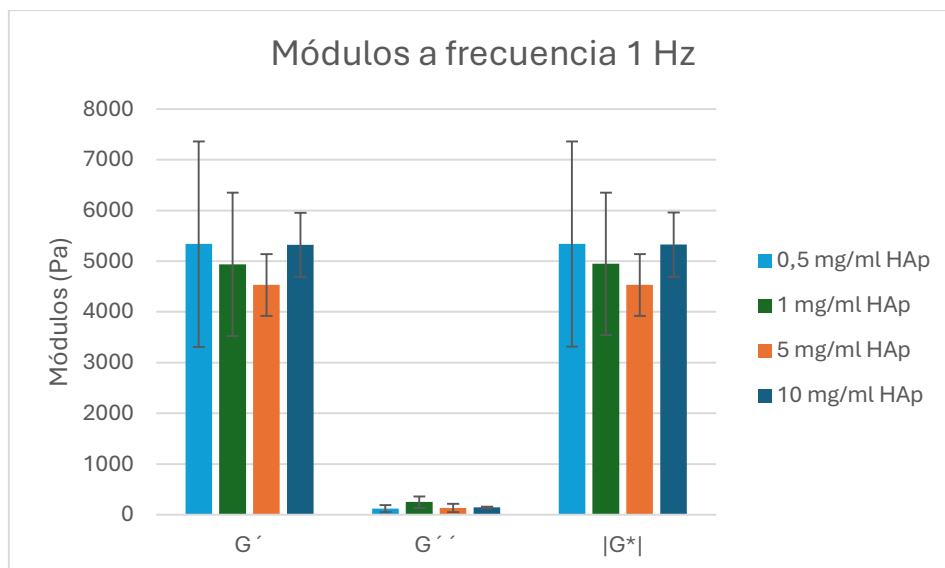
La adición de una mezcla de 50% agua y 50% etanol a los geles con 0.5 mg/ml de HAp (Figura 14) reduce considerablemente los valores de  $G'$  y  $|G^*|$ . Esto sugiere que el etanol interfiere en el proceso de autoensamblaje del ELR, disminuyendo la capacidad de las cadenas poliméricas para formar una red sólida. El agua, por ser altamente polar, facilita la solvatación de las cadenas de ELR, favoreciendo las interacciones moleculares. Sin embargo, el etanol, menos polar, reduce esta solvatación, afectando negativamente la capacidad del ELR para formar una red entrecruzada. Como resultado, la rigidez del gel disminuye, haciéndolo más susceptible a la deformación.



*Figura 14. Módulos a frecuencia 1 Hz de geles de 75mg/ml ERL con otras composiciones*

En los geles con mayor concentración de ELR (125 mg/ml) representados en la Figura 15, se observa un aumento significativo en los valores de  $G'$  y  $|G^*|$  en comparación con los geles de 75 mg/ml. Esto indica que una mayor densidad de ELR proporciona una red más resistente y estable, con mayor capacidad para soportar la deformación. No obstante, al incrementar la concentración de HAp a 1 mg/ml, se detecta un aumento en  $G''$ , lo que indica un comportamiento más viscoelástico. La interacción entre una red más densa y las partículas de HAp parece crear microdominios que interfieren con la distribución homogénea del estrés, lo que provoca una mayor disipación de energía.

A concentraciones de 5 mg/ml de HAp, los valores de  $G'$  y  $G''$  disminuyen ligeramente en comparación con concentraciones menores, lo que sugiere que la aglomeración de partículas de HAp puede estar comprometiendo la red polimérica, reduciendo su rigidez y capacidad para almacenar energía elástica. Sin embargo, en comparación con los geles de 75 mg/ml, los geles de 125 mg/ml muestran mayor estabilidad estructural, lo que sugiere que una red polimérica más densa es menos susceptible a las heterogeneidades introducidas por la HAp.



*Figura 15. Módulos a frecuencia 1 Hz de geles de 125 mg/ml ERL*

Al analizar los módulos de almacenamiento ( $G'$ ), de pérdida ( $G''$ ) y el módulo complejo ( $|G^*|$ ) en función de la frecuencia, se incorporaron barras de error en las Figuras 13, 14 y 15 para reflejar la variabilidad observada entre las formulaciones de geles de ELR con HAp y HRGD- $N_3$ . Estas barras permiten evaluar la consistencia de los datos y la precisión de los resultados obtenidos en los experimentos reológicos. Aunque los datos presentan cierta dispersión, las tendencias principales se mantienen claramente definidas, lo que sugiere que las variaciones no alteran de manera significativa las conclusiones generales sobre el comportamiento de los geles.

En los geles de 75 mg/ml de ELR (Figura 13), se detecta una mayor dispersión de los valores a concentraciones más altas de HAp, específicamente en las formulaciones con 5 mg/ml y 10 mg/ml. Esta variabilidad podría deberse a las heterogeneidades introducidas en la red polimérica a medida que se incrementa la cantidad de HAp, lo que afecta la rigidez y la viscoelasticidad del gel. La formación de microdominios o incluso la aglomeración de partículas de HAp a estas concentraciones puede contribuir a las diferencias observadas entre los experimentos, reflejadas en las barras de error más amplias.

El efecto de HRGD- $N_3$  es aún más evidente en la Figura 14, donde las barras de error muestran una mayor dispersión en comparación con los geles sin HRGD- $N_3$ . La presencia de este componente parece interferir en la formación de una red

polimérica uniforme, lo que genera una menor reproducibilidad de los resultados. Esto sugiere que la interacción entre HRGD-N<sub>3</sub> y HAp no es tan eficiente como en los geles sin HRGD-N<sub>3</sub>, lo que lleva a una estructura menos estable y más heterogénea, afectando así la coherencia de las mediciones.

Por el contrario, en los geles con una mayor concentración de ELR (125 mg/ml) mostrados en la Figura 15, las barras de error son más reducidas, lo que indica una menor variabilidad en los resultados. Esto sugiere que una red polimérica más densa proporciona una mayor estabilidad estructural, reduciendo las fluctuaciones experimentales incluso a concentraciones más altas de HAp. En este caso, la mayor densidad de ELR parece mejorar la capacidad de la red para integrar HAp de manera más uniforme, disminuyendo las heterogeneidades que típicamente aparecen a concentraciones elevadas.

En resumen, las barras de error revelan que la reproducibilidad tiende a disminuir con el aumento de la concentración de HAp y la adición de HRGD-N<sub>3</sub>, reflejando un comportamiento más heterogéneo en la red polimérica. Sin embargo, en geles con una mayor concentración de ELR, la estructura parece ser más robusta y menos susceptible a estas variaciones, lo que resulta en una mayor consistencia entre las repeticiones experimentales.

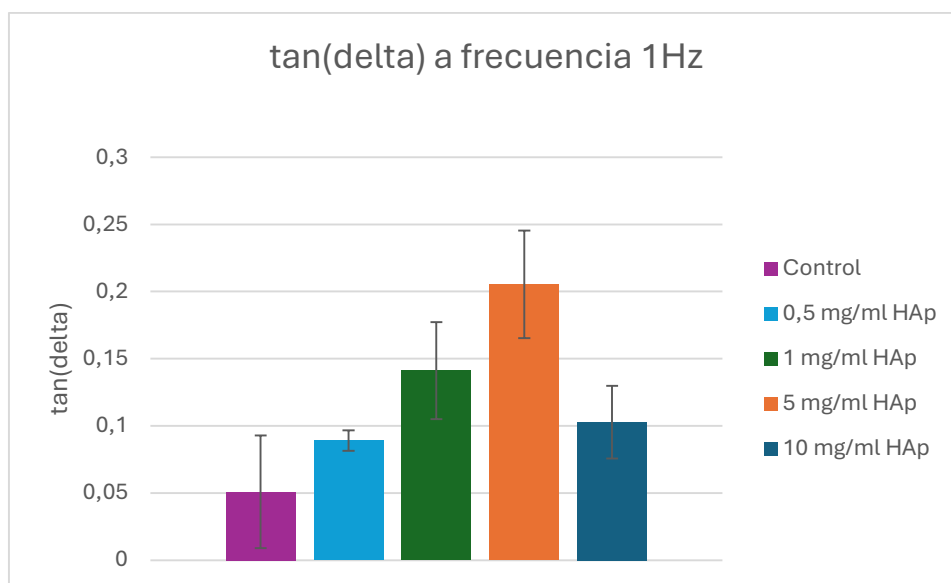
### **Análisis de $\tan(\delta)$ en función de la frecuencia**

Los valores de  $\tan(\delta)$  ofrecen información crucial sobre la relación entre la energía almacenada ( $G'$ ) y la energía disipada ( $G''$ ) durante la deformación de los geles. Un valor bajo de  $\tan(\delta)$  indica que el material es predominantemente elástico, mientras que un valor más elevado sugiere un comportamiento viscoelástico, lo que implica una mayor pérdida de energía.

En la Figura 16, se observa el comportamiento de  $\tan(\delta)$  en geles de 75 mg/ml de ELR con diferentes concentraciones de HAp. El gel control presenta el valor más bajo de  $\tan(\delta)$ , lo que confirma su naturaleza predominantemente elástica y su capacidad para almacenar eficientemente la energía durante la deformación, lo que indica una red polimérica bien estructurada. Con la incorporación de 0.5 mg/ml de HAp,  $\tan(\delta)$  aumenta ligeramente, aunque el gel sigue siendo mayoritariamente elástico. Este

incremento moderado sugiere que la HAp, en pequeñas concentraciones, actúa como un refuerzo que no compromete significativamente la elasticidad del material.

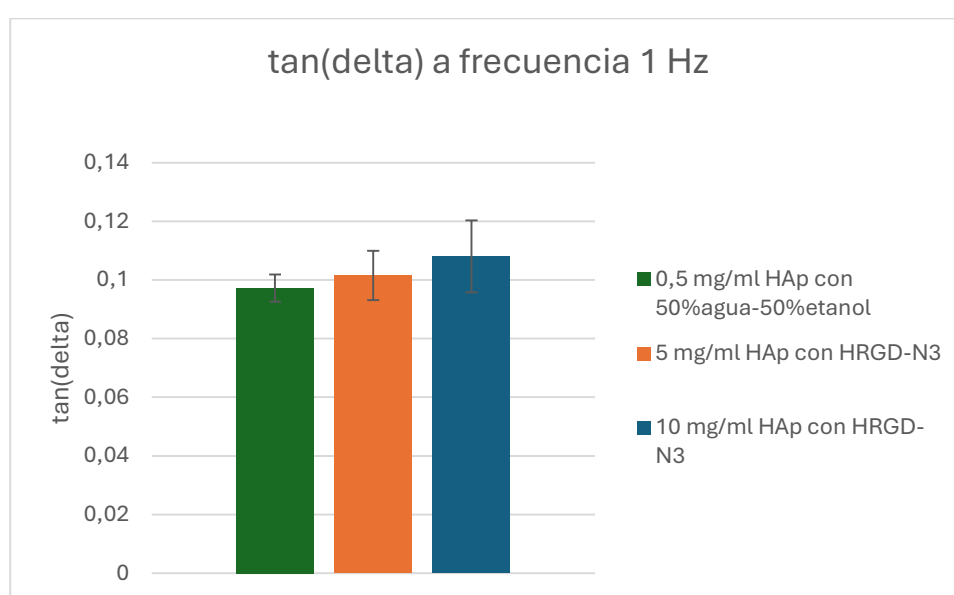
Cuando se incrementa la concentración de HAp a 1 mg/ml, se observa un aumento notable en  $\tan(\delta)$ . Este comportamiento indica que el gel se vuelve más viscoelástico, probablemente debido a la introducción de heterogeneidades en la red polimérica, como la formación de microdominios de HAp, que afectan la uniformidad en la deformación. A 5 mg/ml de HAp,  $\tan(\delta)$  alcanza su valor máximo, lo que refleja una mayor viscoelasticidad y una estructura menos homogénea, con mayor pérdida de energía durante la deformación. Finalmente, con 10 mg/ml de HAp, se produce una ligera disminución en  $\tan(\delta)$ , probablemente debido a la aglomeración de partículas de HAp, lo que genera una estructura más heterogénea, pero con una menor pérdida de energía en comparación con concentraciones intermedias de HAp.



*Figura 16.  $\tan(\delta)$  a frecuencia 1 Hz de geles de 75 mg/ml ELR*

En la Figura 17, se presenta el análisis de  $\tan(\delta)$  a 1 Hz para geles de 75 mg/ml de ELR con diferentes composiciones de HAp y HRGD-N<sub>3</sub>. El gel formado con 0.5 mg/ml de HAp en una mezcla de 50% agua y 50% etanol muestra valores bajos de  $\tan(\delta)$ , lo que refleja un comportamiento predominantemente elástico, similar al de los geles sin etanol. La adición de etanol no parece haber incrementado significativamente la viscoelasticidad del gel, lo que sugiere que la interacción entre el ELR y la HAp no se ve drásticamente afectada por este solvente.

Al incrementar la concentración de HAp a 5 mg/ml e introducir HRGD-N<sub>3</sub>,  $\tan(\delta)$  muestra un aumento, indicando una transición hacia un comportamiento más viscoelástico. La presencia de HRGD-N<sub>3</sub> parece interferir con la estructura de la red polimérica, lo que resulta en una mayor disipación de energía durante la deformación. Con 10 mg/ml de HAp y HRGD-N<sub>3</sub>,  $\tan(\delta)$  alcanza su valor máximo, lo que sugiere que la estructura del gel se ha vuelto aún más viscoelástica, probablemente debido a la mayor concentración de HA y a la interferencia de HRGD-N<sub>3</sub> en la red, creando una estructura más heterogénea y menos eficiente en el almacenamiento de energía.

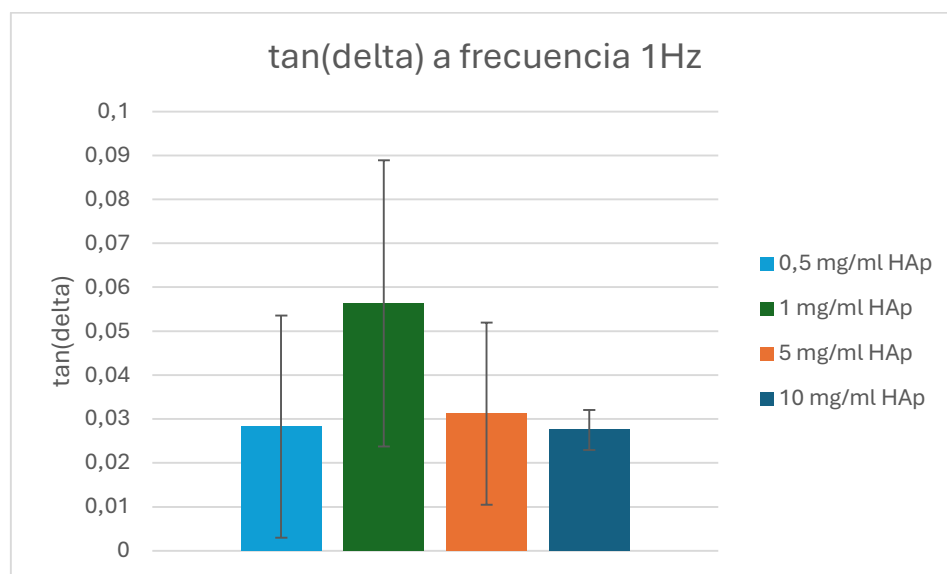


*Figura 17.  $\tan(\delta)$  a frecuencia 1 Hz de geles de 75 mg/ml ELR con distintas composiciones*

En la Figura 18, que muestra el comportamiento de  $\tan(\delta)$  en geles de 125 mg/ml de ELR, se observan diferencias notables en comparación con los geles de menor concentración de ELR. Para los geles con 0.5 mg/ml de HAp,  $\tan(\delta)$  sigue siendo relativamente bajo, lo que indica que la red polimérica es mayoritariamente elástica. La mayor concentración de ELR proporciona una estructura más densa y resistente, lo que permite almacenar eficientemente la energía sin un aumento significativo en la viscoelasticidad.

Al aumentar la concentración de HAp a 1 mg/ml,  $\tan(\delta)$  alcanza su valor más alto, lo que refleja un cambio hacia un comportamiento más viscoelástico. Esto sugiere que, aunque la red polimérica es más densa, la mayor cantidad de HAp introduce heterogeneidades que aumentan la pérdida de energía durante la deformación. A 5

mg/ml de HAp,  $\tan(\delta)$  disminuye, lo que indica una recuperación parcial del carácter elástico del gel, posiblemente debido a una mejor integración de las partículas de HAp en la red polimérica. Finalmente, con 10 mg/ml de HAp,  $\tan(\delta)$  disminuye ligeramente, lo que sugiere que el gel mantiene una buena elasticidad a pesar de la alta concentración de HAp. Esto podría estar relacionado con la capacidad de la red polimérica más densa para manejar mejor las partículas de HAp, evitando una mayor pérdida de energía.



*Figura 18.  $\tan(\delta)$  a frecuencia 1 Hz de geles de 125 mg/ml ELR*

Las barras de error presentadas en las gráficas de los módulos (Figuras 13, 14 y 15) y de  $\tan(\delta)$  (Figuras 16, 17 y 18) proporcionan información crucial sobre la reproducibilidad de los datos y la coherencia de los resultados obtenidos en los experimentos reológicos.

En los geles de 75 mg/ml de ELR (Figuras 13 y 16), se observa una mayor dispersión en los valores conforme aumenta la concentración de HAp, especialmente en las formulaciones con 5 mg/ml y 10 mg/ml. Esta variabilidad podría deberse a la introducción de heterogeneidades en la red polimérica, como la formación de microdominios de HAp o la aglomeración de partículas, lo que afecta la uniformidad del gel y aumenta la variabilidad en las mediciones. Este fenómeno es particularmente evidente en los valores de  $\tan(\delta)$ , donde las barras de error se amplían en concentraciones intermedias de HAp (5 mg/ml). En contraste, las concentraciones más bajas de HAp muestran una mayor consistencia en los

resultados, con barras de error más estrechas, lo que sugiere una mejor integración de los componentes en estas formulaciones.

Por otro lado, los geles que contienen HRGD-N<sub>3</sub> (Figuras 14 y 17) presentan una mayor variabilidad en comparación con los geles que contienen solo ELR y HAp. Esta mayor dispersión podría estar relacionada con la interferencia de HRGD-N<sub>3</sub> en la estructura de la red polimérica, lo que introduce más heterogeneidades y dificultades para formar una red bien entrecruzada, afectando la coherencia de los resultados. En estos casos, la adición de HRGD-N<sub>3</sub> parece debilitar la capacidad de la red polimérica para integrarse homogéneamente, lo que se refleja en la mayor dispersión de las mediciones.

En cuanto a los geles con mayor concentración de ELR (125 mg/ml, Figuras 15 y 18), se observa una mayor consistencia en los resultados, con barras de error más reducidas en comparación con los geles de 75 mg/ml de ELR. Esto sugiere que una red polimérica más densa y estable es capaz de incorporar mejor las partículas de HAp, reduciendo la heterogeneidad del sistema y permitiendo obtener mediciones más reproducibles. No obstante, en concentraciones intermedias de HAp, se detecta una mayor variabilidad, reflejada en barras de error más amplias, lo que podría estar relacionado con la formación de microdominios de HAp que introducen heterogeneidades en la estructura del gel.

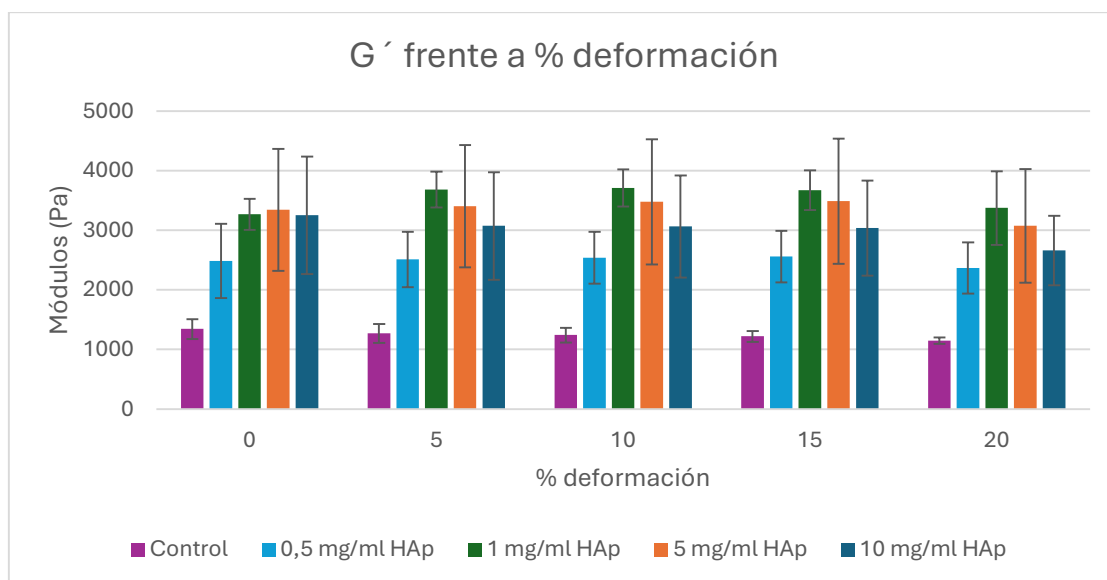
En conjunto, los resultados sugieren que la reproducibilidad de los datos tiende a disminuir con el aumento de la concentración de HAp y la adición de HRGD-N<sub>3</sub>, lo que refleja un comportamiento más heterogéneo en la red polimérica. Por otro lado, en los geles con mayor concentración de ELR (125 mg/ml), la estructura parece ser más robusta y menos susceptible a estas variaciones, lo que se traduce en una mayor consistencia entre las repeticiones experimentales.

### **Análisis de los módulos $G'$ , $G''$ , $|G^*|$ y $\tan(\delta)$ en función de la deformación**

El análisis de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ), de pérdida ( $G''$ ) y del módulo complejo ( $|G^*|$ ) en función de la deformación, como se muestra en la Figura 19, revela que los geles de 75 mg/ml de ELR mantienen un comportamiento relativamente estable en la mayoría de los casos.  $G'$  se mantiene casi constante, lo que sugiere que la estructura del gel es lo suficientemente robusta para resistir

deformaciones sin alterar significativamente su capacidad de almacenamiento de energía elástica. Sin embargo, a medida que la deformación aumenta, en algunos geles se aprecia una ligera disminución de  $G'$ , lo que indica una relajación estructural bajo condiciones de mayor estrés.

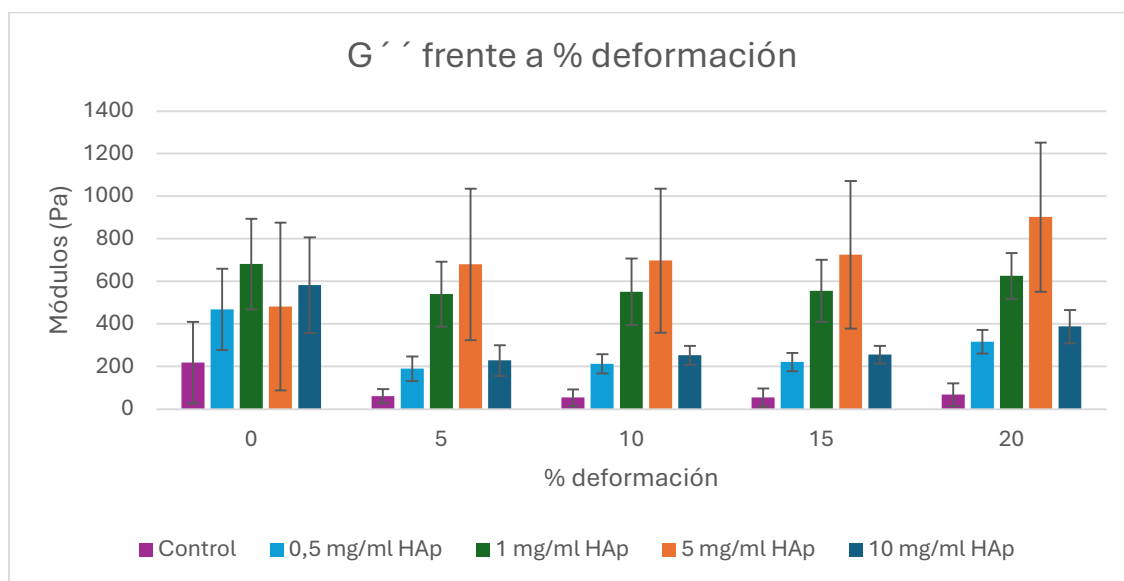
En los geles de control, que no contienen HAp, los valores de  $G'$  son más bajos en comparación con los geles que incorporan HAp, lo que confirma que la hidroxiapatita refuerza la estructura. Con el aumento de la concentración de HAp,  $G'$  incrementa significativamente, sobre todo en las formulaciones que contienen 5 mg/ml y 10 mg/ml de HAp. Esto sugiere que la presencia de HAp favorece un entrecruzamiento más eficaz de la red polimérica, haciendo que el gel sea más resistente a la deformación.



*Figura 19.  $G'$  vs. deformación de geles de 75 mg/ml de ELR*

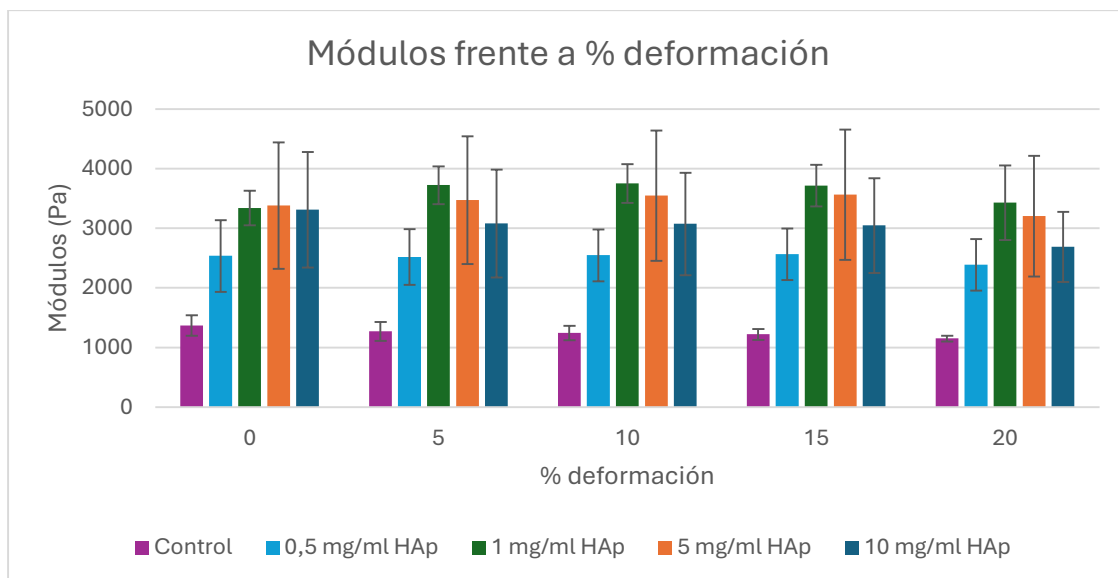
En la Figura 20, los módulos de pérdida ( $G''$ ) muestran una mayor dispersión, especialmente en las formulaciones con concentraciones más altas de HAp. Este comportamiento indica que la viscoelasticidad del gel aumenta a medida que se incrementa el contenido de HAp, ya que la energía se disipa más durante la deformación. Las formulaciones con 5 mg/ml y 10 mg/ml de HAp presentan valores más elevados de  $G''$ , lo que sugiere que la presencia de microdominios de HAp

genera áreas dentro del gel que se relajan y contribuyen a una mayor pérdida de energía.



*Figura 20.  $G''$  vs. deformación de geles de 75 mg/ml de ELR*

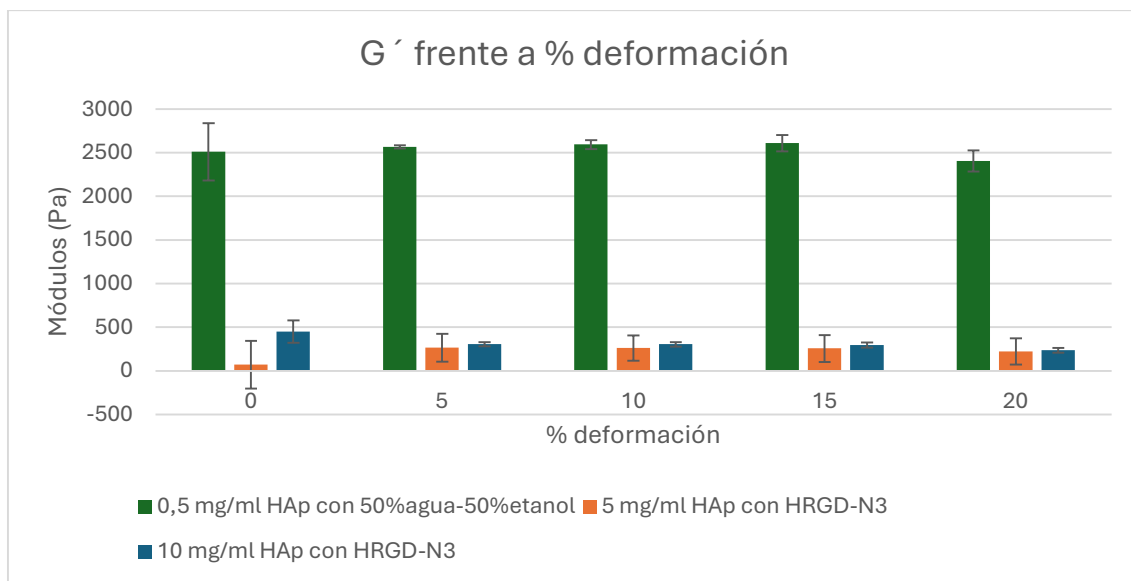
El análisis del módulo complejo ( $|G^*|$ ) en la Figura 21 refuerza esta tendencia observada en  $G'$  y  $G''$ . A medida que aumenta la concentración de HAp, también lo hace el valor de  $|G^*|$ , lo que indica una mayor rigidez total del material. Las formulaciones con 5 mg/ml y 10 mg/ml de HA presentan los valores más altos de  $|G^*|$ , destacando el papel de la HAp como un agente que refuerza significativamente la red polimérica al actuar como puntos adicionales de entrecruzamiento que mejoran la resistencia del gel ante la deformación.



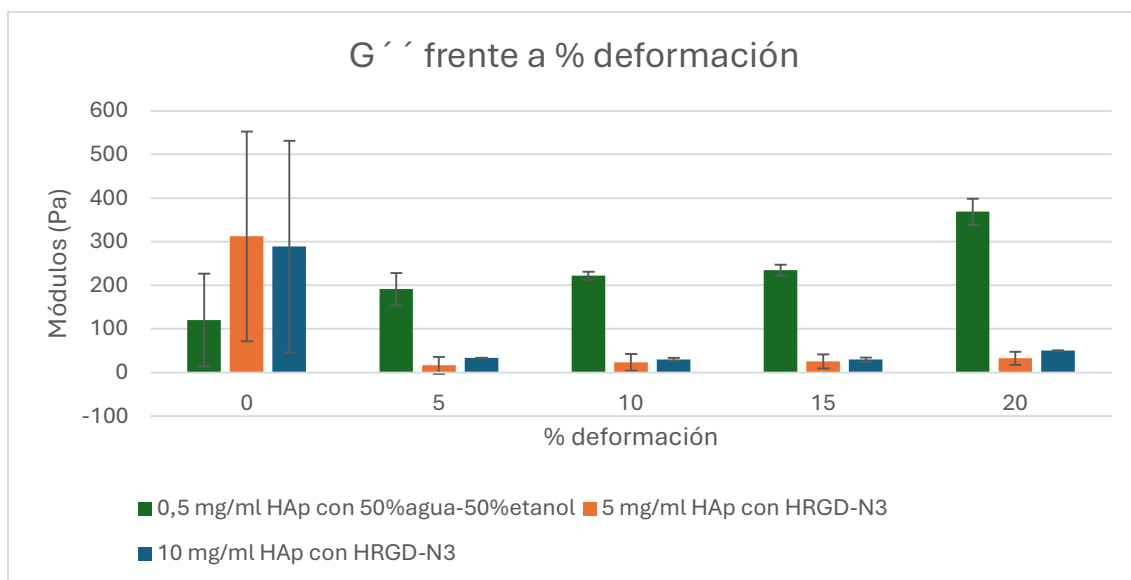
*Figura 21.  $|G^*|$  vs. deformación de geles de 75 mg/ml de ELR*

Cuando se comparan los resultados con los geles que contienen HRGD- $N_3$  (Figuras 22-24), los valores de  $G'$ ,  $G''$  y  $|G^*|$  son notablemente más bajos en comparación con los geles que contienen VKV- $N_3$ . Esto sugiere que HRGD- $N_3$  no forma una estructura de entrecruzamiento tan eficiente con la HAp, resultando en una red polimérica menos rígida. Además, la mayor dispersión de  $G''$  en estos geles refleja un comportamiento más viscoelástico, con una mayor pérdida de energía durante la deformación.

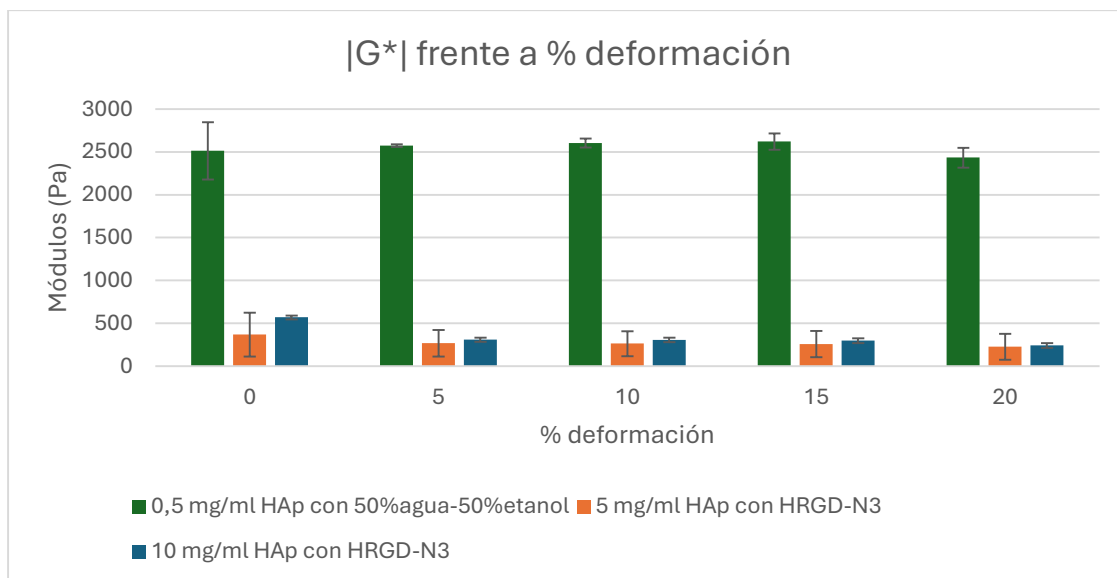
En cuanto a los geles que incorporan una mezcla de 50% agua y 50% etanol, estos muestran un comportamiento intermedio en cuanto a rigidez, con valores de  $G'$  y  $G''$  menores que en los geles con mayores concentraciones de HAp. Esto sugiere que el etanol afecta la homogeneidad de la red polimérica, generando una estructura menos eficiente en el almacenamiento de energía elástica.



*Figura 22. G' vs. deformación de geles de 75 mg/ml de ELR*

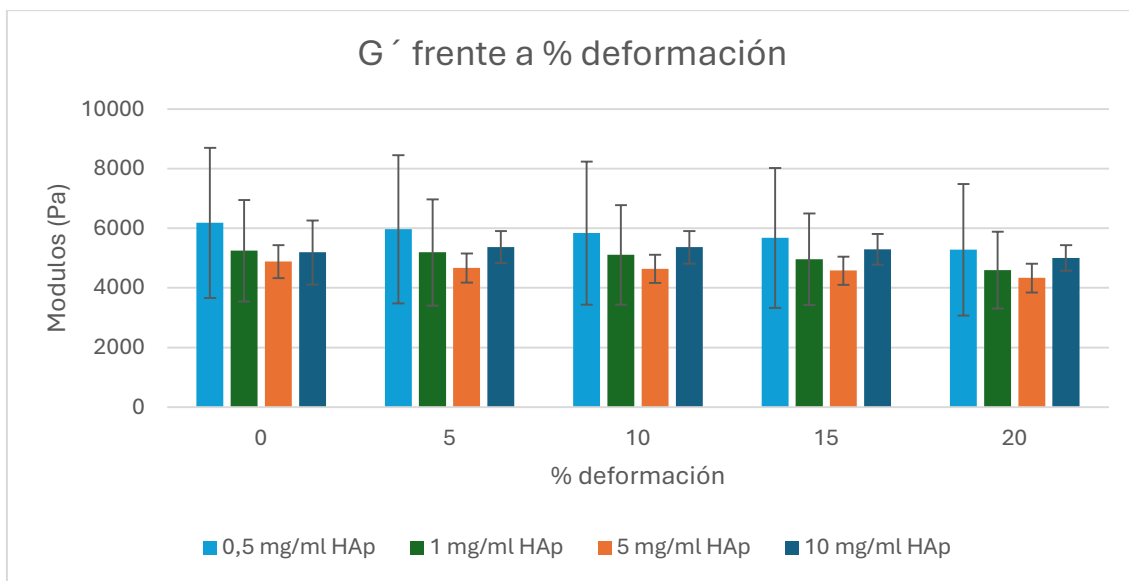


*Figura 23. G'' vs. deformación de geles de 75 mg/ml de ELR*

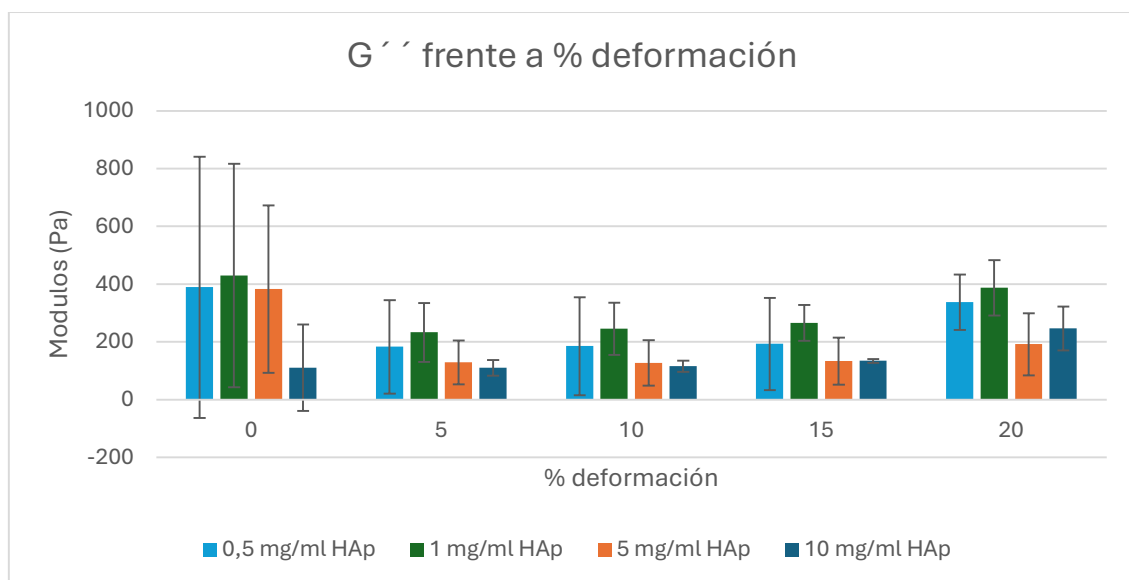


*Figura 24.  $|G^*|$  vs. deformación de geles de 75 mg/ml de ELR*

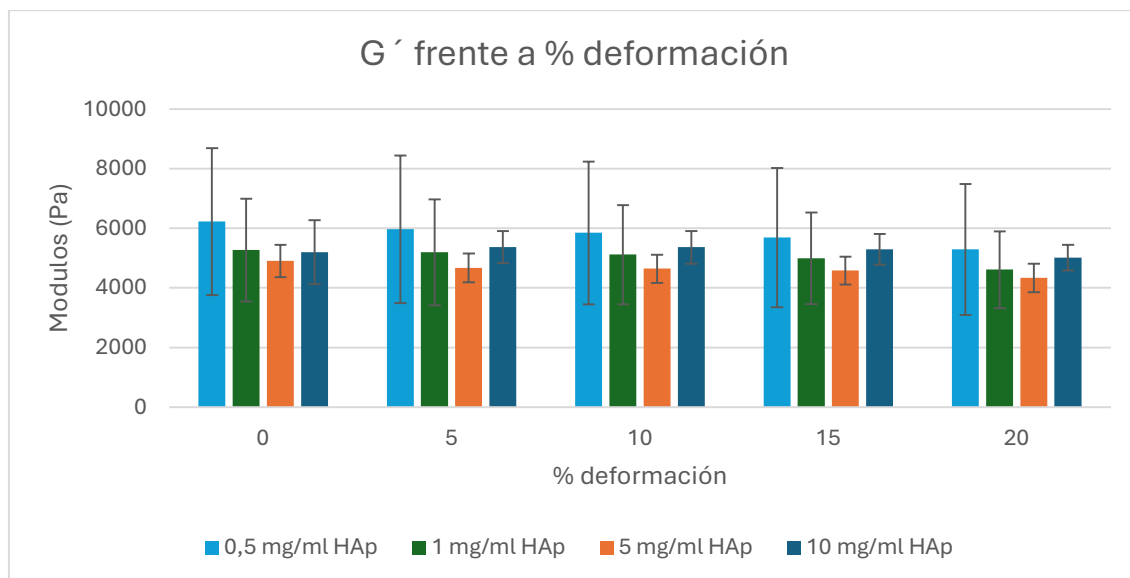
Por otro lado, los geles de 125 mg/ml de ELR (Figuras 25-27) presentan una tendencia similar a la observada en los geles de menor concentración, con incrementos en  $G'$ ,  $G''$  y  $|G^*|$  a medida que aumenta la concentración de HAp. Las formulaciones con 5 mg/ml y 10 mg/ml de HAp exhiben los valores más altos de  $G'$  y  $|G^*|$ , lo que indica que una red polimérica más densa es capaz de soportar mejor las deformaciones sin comprometer su rigidez. Sin embargo, se observa una mayor dispersión en  $G''$  en estas formulaciones, lo que indica que la viscoelasticidad aumenta cuando la red polimérica se vuelve más heterogénea, posiblemente debido a la aglomeración de partículas de HAp.



*Figura 25. G' vs. deformación de geles de 125 mg/ml de ELR*



*Figura 26. G'' vs. deformación de geles de 125 mg/ml de ELR*



*Figura 27.  $|G^*|$  vs. deformación de geles de 125 mg/ml de ELR*

En conclusión, el análisis de los módulos  $G'$ ,  $G''$  y  $|G^*|$  en función de la deformación revela que la incorporación de HAp refuerza la red polimérica de ELR, aumentando su rigidez y resistencia a la deformación. Sin embargo, a concentraciones más altas de HAp, también se incrementa la viscoelasticidad, lo que sugiere la formación de una estructura menos homogénea con una mayor disipación de energía. Los geles que contienen HRGD- $N_3$  presentan una menor rigidez y mayor viscoelasticidad en comparación con los geles con VKV- $N_3$ , mientras que la mezcla de etanol y agua genera una estructura más débil y heterogénea, menos eficiente en términos de almacenamiento de energía elástica.

Las barras de error en los gráficos de los módulos frente al porcentaje de deformación son esenciales para evaluar la precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos en los experimentos reológicos. En los geles de 75 mg/ml de ELR, se observa que estas barras varían considerablemente según la concentración de HAp, proporcionando información clave sobre la variabilidad en las propiedades mecánicas de los geles.

En los geles de control, que no contienen HAp, las barras de error son pequeñas, lo que sugiere una red polimérica homogénea y estable, con datos consistentemente reproducibles. Esto indica que no existen heterogeneidades significativas en la estructura de estos geles, lo que asegura una uniformidad en su comportamiento mecánico. Sin embargo, al incorporar concentraciones crecientes de HAp,

especialmente en las formulaciones con 5 mg/ml y 10 mg/ml, se observa una ampliación notable en las barras de error. Este aumento en la variabilidad parece estar relacionado con la formación de agregados o microdominios de HAp dentro de la red de ELR, generando una estructura más heterogénea y, por tanto, mayor dispersión en los resultados obtenidos. En particular, los gráficos de  $G'$  y  $G''$  reflejan que, aunque los geles con HAp son más rígidos, también muestran una mayor variabilidad en la disipación de energía, lo que sugiere un comportamiento mecánico más impredecible.

Los geles que incorporan HRGD- $N_3$  muestran una tendencia similar, pero con una mayor ampliación de las barras de error en comparación con los geles que contienen VKV- $N_3$ . Esto sugiere que la interacción entre HRGD- $N_3$  y HAp no es tan eficiente para formar una red de entrecruzamiento homogénea. La mayor variabilidad en los resultados indica que estas formulaciones generan una estructura polimérica menos estable, con una mayor dispersión en las mediciones reológicas. Además, en los geles formados con una mezcla de 50% agua y 50% etanol, también se observa una mayor dispersión, lo que podría reflejar un impacto negativo del etanol sobre la uniformidad de la red polimérica. La ampliación de las barras de error en estos casos indica que el etanol podría estar afectando la solubilidad y la distribución homogénea de los componentes del gel, generando un comportamiento menos predecible en las propiedades mecánicas del material.

Por el contrario, los geles de 125 mg/ml de ELR presentan una tendencia diferente. En general, las barras de error son más reducidas en comparación con los geles de 75 mg/ml, lo que sugiere una mayor estabilidad y uniformidad en la red polimérica. Esto implica que la mayor concentración de ELR proporciona una estructura más densa y robusta, reduciendo las heterogeneidades en la matriz del gel y permitiendo obtener resultados más reproducibles. Sin embargo, incluso en estos geles, las barras de error se amplían ligeramente a medida que aumenta la concentración de HA, especialmente en  $G''$ . Esto podría estar relacionado con la formación de microdominios de HAp a concentraciones más altas, que introducen cierta variabilidad en la estructura del gel, aunque no tan marcada como en los geles de menor concentración de ELR.

En resumen, el análisis de las barras de error revela que la reproducibilidad y precisión de los resultados están principalmente influenciadas por la concentración de HAp y el tipo de ELR empleado. Las concentraciones más altas de HAp tienden a introducir mayor variabilidad, especialmente en los geles con HRGD-N<sub>3</sub> y en aquellos preparados con una mezcla de agua y etanol, lo que refleja la formación de estructuras más heterogéneas. Por otro lado, los geles con una mayor concentración de ELR presentan una red polimérica más densa y estable, lo que contribuye a una mayor consistencia en los resultados experimentales y a una menor dispersión en las mediciones.

En esta sección, se compararon los resultados obtenidos en los análisis reológicos de los geles de ELR modificados, considerando tanto su comportamiento frente a la frecuencia como frente al porcentaje de deformación. Estos dos enfoques proporcionan una visión detallada de cómo las concentraciones de HAp, los diferentes tipos de ELR, y la inclusión de solventes o aditivos como el HRGD-N<sub>3</sub>, influyen en las propiedades mecánicas y viscoelásticas de los geles.

En el análisis de frecuencia, los geles de 75 mg/ml de ELR mostraron un comportamiento predominantemente elástico, con valores elevados de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y valores bajos de  $\tan(\delta)$ , lo que indica una buena capacidad para almacenar energía elástica. Este comportamiento se mantuvo constante en los geles con concentraciones más bajas de HAp, pero, a medida que se incrementa la cantidad de HAp, especialmente en los geles con 5 mg/ml y 10 mg/ml, se observó un aumento de la viscoelasticidad. Esto se refleja en los incrementos de  $G''$  y  $\tan(\delta)$ , lo que indica que, aunque la rigidez de la red polimérica mejora, el gel pierde parte de su capacidad para recuperar eficientemente su forma tras la deformación. Esta limitación podría ser significativa en aplicaciones que requieren una alta estabilidad estructural.

En el análisis frente a la deformación, se evidenció que los módulos  $G'$  y  $G''$  también se mantuvieron estables en los geles de control a lo largo del rango de deformación. Sin embargo, al incrementar la concentración de HAp, los valores de  $G'$  aumentaron, sugiriendo un refuerzo estructural del gel. De manera similar al análisis de frecuencia, la viscoelasticidad se hizo más pronunciada en los geles con concentraciones más altas de HAp, reflejada en el mayor  $\tan(\delta)$  y la ampliación de

las barras de error, lo que confirma que la adición de HAp introduce heterogeneidades en la red polimérica. Estas heterogeneidades afectan la consistencia del gel y su capacidad para manejar de manera uniforme el estrés mecánico.

Un aspecto clave al comparar ambos análisis fue el comportamiento de los geles con HRGD-N<sub>3</sub>. En ambos casos, los resultados mostraron una menor rigidez y mayor viscoelasticidad en comparación con los geles formados con VKV-N<sub>3</sub>. Esto sugiere que el tipo de ELR desempeña un papel crucial en la formación de la red polimérica y en las interacciones con la HAp. Los geles de HRGD-N<sub>3</sub>, con valores más altos de  $\tan(\delta)$  y barras de error más amplias, presentaron una estructura menos consistente y más propensa a la disipación de energía, lo que los hace más adecuados para aplicaciones que requieran materiales con mayor deformabilidad o capacidad de amortiguación.

En contraste, los geles con una concentración de 125 mg/ml de ELR mostraron una mayor estabilidad estructural en ambos análisis. Los valores de  $G'$  y  $G''$  fueron más elevados, y las barras de error más reducidas, lo que sugiere una red polimérica más densa y homogénea. Aunque la viscoelasticidad aumentó ligeramente con concentraciones más altas de HAp, el comportamiento general de los geles de 125 mg/ml de ELR se mantuvo más elástico y consistente que en los geles de 75 mg/ml. Esto sugiere que una mayor concentración de ELR ayuda a mitigar los efectos negativos de la HAp en términos de heterogeneidad estructural y viscoelasticidad.

En conclusión, los resultados de ambos análisis indican que la incorporación de HAp refuerza la estructura de los geles, pero también introduce mayores niveles de viscoelasticidad, particularmente en los geles con concentraciones más bajas de ELR. Los geles con HRGD-N<sub>3</sub> y aquellos preparados con una mezcla de agua y etanol tienden a ser más viscoelásticos y menos consistentes, mientras que los geles de 125 mg/ml de ELR mostraron una mayor estabilidad y reproducibilidad. Esto sugiere que estos últimos son más adecuados para aplicaciones que requieren rigidez y resistencia mecánica. Estos resultados servirán de base para las conclusiones, donde se integrarán todos los hallazgos con mayor profundidad.

## 7. Conclusiones y líneas futuras de investigación

En este Trabajo Fin de Grado, se ha llevado a cabo un estudio detallado sobre el desarrollo y la caracterización de biotintas basadas en recombinámeros tipo elastina (ELRs) e hidroxiapatita (HAp) con el objetivo de aplicarlas en la regeneración ósea. A partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

**Modificación y caracterización de polímeros:** Los ELRs, VKV-ciclooctino y HRGD-N<sub>3</sub>, fueron modificados de manera efectiva utilizando la química "click", lo cual fue verificado mediante técnicas analíticas avanzadas como FTIR, RMN y DSC. Estas modificaciones permitieron la incorporación exitosa de los grupos funcionales necesarios para la formación de geles con propiedades mecánicas específicas, adecuadas para su aplicación en ingeniería de tejidos.

**Formación de geles y evaluación reológica:** Se lograron desarrollar geles con diversas concentraciones de HAp, lo que permitió evaluar la influencia de estas variaciones en las propiedades mecánicas y viscoelásticas del material resultante. Se observó que los geles con mayores concentraciones de HAp exhibieron una mayor rigidez, acompañada de un incremento en la viscoelasticidad, lo que sugiere la necesidad de encontrar un equilibrio adecuado entre elasticidad y resistencia para maximizar su funcionalidad en aplicaciones biomédicas.

**Impacto de la formulación en las propiedades del gel:** Los estudios reológicos realizados destacaron la importancia crítica de la formulación, particularmente en lo que respecta a la concentración de HAp y el tipo de ELR utilizado. Mientras que los geles formados con VKV-N<sub>3</sub> demostraron una mayor rigidez, aquellos compuestos con HRGD-N<sub>3</sub> presentaron una mayor flexibilidad, lo que podría resultar ventajoso en aplicaciones que requieren materiales con un grado de deformabilidad más alto.

**Efecto de los solventes en la homogeneidad del gel:** La introducción de una mezcla de 50% agua y 50% etanol no mejoró de manera significativa las propiedades mecánicas de los geles. De hecho, los resultados sugieren que la presencia de etanol podría afectar negativamente la uniformidad de la red polimérica, incrementando la

viscoelasticidad y reduciendo la rigidez, lo que podría limitar su aplicabilidad en ciertas situaciones.

### **Líneas Futuras**

**Optimización de la formulación:** Será esencial profundizar en la investigación sobre cómo ajustar de manera óptima las concentraciones de HAp y ELRs para mejorar la estabilidad mecánica de los geles sin comprometer su elasticidad, buscando un balance ideal para diferentes aplicaciones. Además, será crucial evaluar la inyectabilidad de los geles, ese es un factor fundamental para asegurar que puedan ser administrados de manera mínimamente invasiva. Optimizar las propiedades reológicas para facilitar su administración sin comprometer la integridad estructural de los geles será un aspecto clave en su implementación clínica.

**Estudios a largo plazo y evaluaciones in vivo:** Se recomienda realizar estudios a largo plazo bajo condiciones fisiológicas simuladas y llevar a cabo pruebas preclínicas in vivo para evaluar de manera exhaustiva la biocompatibilidad y la eficacia de estos geles en la regeneración ósea, asegurando que cumplan con los requisitos clínicos necesarios.

**Incorporación de factores bioactivos:** La exploración de la integración de factores de crecimiento u otros bioactivos en los geles podría potenciar sus propiedades osteogénicas, mejorando así su desempeño en la regeneración tisular.

**Ampliación del estudio a otros polímeros:** Será beneficioso examinar el uso de otros polímeros recombinantes o sintéticos en combinación con HAp, con el fin de desarrollar nuevas biotintas que ofrezcan características mejoradas, ampliando las posibilidades de su aplicación en diversas áreas de la ingeniería de tejidos.

En conjunto, estas conclusiones y propuestas para futuras líneas de investigación no solo validan el enfoque y la metodología empleados en este trabajo, sino que también proporcionan una base sólida para continuar avanzando en la optimización y aplicación de biotintas en el campo de la regeneración ósea y la ingeniería de tejidos.

## 8. Bibliografía

1. Allen, N. B., Abar, B., Johnson, L., Burbano, J., Danilkowicz, R. M., & Adams, S. B. (2022). 3D-bioprinted GelMA-gelatin-hydroxyapatite osteoblast-laden composite hydrogels for bone tissue engineering. *Bioprinting*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00196>
2. Leberfinger, A. N., Dinda, S., Wu, Y., Koduru, S. V., Ozbolat, V., Ravnic, D. J., & Ozbolat, I. T. (2019). Bioprinting functional tissues. *Acta biomaterialia*, 95, 32–49. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.009>
3. Hassan, M. N., Yassin, M. A., Suliman, S., Lie, S. A., Gjengedal, H., & Mustafa, K. (2019). The bone regeneration capacity of 3D-printed templates in calvarial defect models: A systematic review and meta-analysis. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 91, pp. 1–23). Acta Materialia Inc. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.017>
4. Zhang, J., Wehrle, E., Rubert, M., & Müller, R. (2021). 3d bioprinting of human tissues: Biofabrication, bioinks and bioreactors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22083971>
5. Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances*, 34(4), 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
6. Li, Y., & Liu, C. (2017). Nanomaterial-based bone regeneration. In *Nanoscale* (Vol. 9, Issue 15, pp. 4862–4874). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7nr00835j>
7. Ielo, I., Calabrese, G., de Luca, G., & Conoci, S. (2022). Recent Advances in Hydroxyapatite-Based Biocomposites for Bone Tissue Regeneration in Orthopedics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23179721>
8. Egido-Moreno, S., Valls-Roca-umbert, J., Céspedes-Sánchez, J. M., López-López, J., & Velasco-Ortega, E. (2021). Clinical efficacy of mesenchymal stem cells in bone regeneration in oral implantology. Systematic review and meta-analysis. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 3, pp. 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph18030894>
9. Gungor-Ozkerim, P. S., , Inci, I., , Zhang, Y. S., , Khademhosseini, A., , & Dokmeci, M. R., (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials science*, 6(5), 915–946. <https://doi.org/10.1039/c7bm00765e>
10. Raees, S., Ullah, F., Javed, F., Akil, H. M., Jadoon Khan, M., Safdar, M., Din, I. U., Alotaibi, M. A., Alharthi, A. I., Bakht, M. A., Ahmad, A., & Nassar, A. A. (2023). Classification, processing, and applications of bioink and 3D bioprinting: A detailed review. *International journal of biological macromolecules*, 232, 123476. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123476>

11. Li, N., Guo, R., & Zhang, Z. J. (2021). Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 630488. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630488>
12. CAS Science Team. "Fundamentos de la química click y la química biortogonal." Disponible en: <https://www.cas.org/es-es/resources/cas-insights/emerging-science/key-insights-click-chemistry-and-bioorthogonal-chemistry>
13. Savin, A. "Química orgánica - Química click." Disponible en: <https://www.quimicaorganica.org/blog-usuarios-quimica-organica/918-qu%C3%ADmica-click-2.html>
14. Guadarrama, P., López-Méndez, L. J., Cabrera-Quñones, N. C., & Cruz Hernández, C. A. (2023). "Versatile as no other, click chemistry and its relevance in multiple areas: From materials science to pharmaceutical research." *Educación Química*, 34(1), 60–69. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2023.1.84649>
15. Magri, A. M. P., Parisi, J. R., de Andrade, A. L. M., & Rennó, A. C. M. (2021). Bone substitutes and photobiomodulation in bone regeneration: A systematic review in animal experimental studies. In *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* (Vol. 109, Issue 9, pp. 1765–1775). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37170>
16. Szcześ, A., Hołysz, L., & Chibowski, E. (2017). Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 249, pp. 321–330). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>
17. Ghiasi, B., Sefidbakht, Y., Mozaffari-Jovin, S., Gharehcheloo, B., Mehrarya, M., Khodadadi, A., Rezaei, M., Ranaei Siadat, S. O., & Uskoković, V. (2020). Hydroxyapatite as a biomaterial—a gift that keeps on giving. In *Drug Development and Industrial Pharmacy* (Vol. 46, Issue 7, pp. 1035–1062). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1776321>
18. Mondal, S., Park, S., Choi, J., Vu, T. T. H., Doan, V. H. M., Vo, T. T., Lee, B., & Oh, J. (2023). Hydroxyapatite: A journey from biomaterials to advanced functional materials. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 321). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103013>
19. Rodríguez-Cabello, J. C., Martín, L., Alonso, M., Arias, F. J., & Testera, A. M. (2009). "Recombinamers" as advanced materials for the post-oil age. In *Polymer* (Vol. 50, Issue 22, pp. 5159–5169). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.08.032>
20. Girotti, A., Orbanic, D., Ibáñez-Fonseca, A., Gonzalez-Obeso, C., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2015). Recombinant Technology in the Development of Materials and Systems for Soft-Tissue Repair. *Advanced Healthcare Materials*, 4(16), 2423–2455. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500152>

21. Gonzalez de Torre, I., Alonso, M., & Rodriguez-Cabello, J. C. (2020). Elastin-Based Materials: Promising Candidates for Cardiac Tissue Regeneration. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00657>
22. Fonseca, A. I., Carlos, J., & Cabello, R. Synthesis and characterization of a silk-elastin-like recombinamer fused to enhanced green fluorescent protein (SELR-EGFP) for the achievement of self-assembled fluorescent nanoparticles and physically cross-linked hydrogels.
23. Matilde, D., Rodrigo, A., Carlos, J., & Cabello, R. (n.d.). Tesis doctoral: Biofunctional hydrogels based on elastin-like recombinamers as extracellular matrix analogues.
24. Herrero-Vanrell, R., Rincón, A. C., Alonso, M., Reboto, V., Molina-Martinez, I. T., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2005). Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release. *Journal of Controlled Release*, 102(1), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.001>
25. Rodríguez-Cabello, J. C., Girotti, A., Ribeiro, A., & Arias, F. J. (2012). Synthesis of genetically engineered protein polymers (recombinamers) as an example of advanced self-assembled smart materials. *Methods in Molecular Biology*, 811, 17–38. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-388-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-388-2_2)
26. Santos, M., Serrano-Dúcar, S., González-Valdivieso, J., Vallejo, R., Girotti, A., Cuadrado, P., & Arias, F. J. (2018). Genetically Engineered Elastin-based Biomaterials for Biomedical Applications. *Current Medicinal Chemistry*, 26(40), 7117–7146. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180508094637>
27. Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.” *Photosynthesis Research*, 101(2–3), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>
28. ThermoFisher Scientific. “Espectroscopia FTIR.” Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/safety-security-threat-detection/technologies.html#fitr-spectroscopy>
29. mks Newport. “Technical Note: Introduction to FTIR Spectroscopy.” Disponible en: <https://www.newport.com/n/introduction-to-ftir-spectroscopy>
30. Velandia Cabra, J. R. (2018). “Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja.” *Revista Ontare*, 5. <https://doi.org/10.21158/23823399.v5.n0.2017.2005>
31. División De Espectroscopía, A. V. “Sistemas FTIR para la caracterización de polímeros: control de calidad y análisis estructural.”

32. Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). "How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material." *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97–118. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>
33. Suriñach, S., Baró, M. D., Bordas, S., Clavaguera, N., & Clavaguera-Mora, M. T. "La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales."
34. Thomas, L. C. (2005). *An Introduction to the Techniques of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated DSC®*.
35. "THERMAL ANALYSIS OF POLYMERS - Fundamentals and Applications."
36. Pungor, E. (1995). *A Practical Guide to Instrumental Analysis*. Boca Raton.
37. Schick, C. (2009). "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(6), 1589–1611. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3169-y>
38. Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA. "Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear." Disponible en: <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopia-de-resonancia-magnetica-nuclear>
39. Pérez, G. "Espectroscopia de Resonancia magnética nuclear." Disponible en: [https://www.espectrometria.com/espectroscopia\\_de\\_resonancia\\_magnetica\\_nuclear](https://www.espectrometria.com/espectroscopia_de_resonancia_magnetica_nuclear)
40. Laurella, S. L. "Resonancia magnética nuclear: Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares."
41. Valcárcel, J. P., González, H., & Valcárcel, D. H. (2008). "Espectroscopia. Fundamento de la resonancia magnética nuclear." *Entornos*, 21, 89–94.
42. "TEMA 10. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR." Disponible en: <https://www.uv.es/jcastell/Espectroscopia.pdf>
43. Pastor Calvo, P. "Recubrimiento de membranas de PVDF utilizando recombinámeros tipo elastina, ELRs, para diferenciación osteogénica."
44. Misbah, M. H., Quintanilla-Sierra, L., Alonso, M., Rodríguez-Cabello, J. C., & Santos, M. (2024). "In-situ formation of elastin-like recombinamer hydrogels with tunable viscoelasticity through efficient one-pot process." *Materials Today Bio*, 25, 100999. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.100999>
45. Mezger, T. G. (2020). *The Rheology Handbook: For Users of Rotational and Oscillatory Rheometers* (5th ed.). Vincentz Network.
46. Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic Properties of Polymers* (3rd ed.). John Wiley & Sons.

47. Winter, H. H., & Chambon, F. (1986). "Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point." *Journal of Rheology*, 30(2), 367-382. <https://doi.org/10.1122/1.549853>
48. Chaudhuri, O., Parekh, S. H., & Fletcher, D. A. (2007). "Reversible Stress Softening of Actin Networks." *Nature*, 445(7125), 295-298. <https://doi.org/10.1038/nature05459>
49. Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). "How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material." *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97-118. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>
50. Calvert, P. (2009). "Hydrogels for Soft Machines." *Advanced Materials*, 21(7), 743-756. <https://doi.org/10.1002/adma.200802106>
51. Rodríguez-Cabello, J. C., Martín, L., Alonso, M., Arias, F. J., & Testera, A. M. (2009). "Recombinamers as Advanced Materials for the Post-Oil Age." *Polymer*, 50(22), 5159-5169. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.08.032>

## 9. Anexos.

