



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Desarrollo de una biotinta basada en hidrogeles granulares para la regeneración de tejidos

Autor/a:

D. Jorge Pérez Gutiérrez

Tutor/a:

D.ª María Puertas Bartolomé

D. Sergio Acosta Rodríguez

Valladolid, 4 de Septiembre de 2025



TÍTULO:	Desarrollo de una biotinta basada en hidrogeles granulares para la regeneración de tejidos
AUTOR/A:	D. Jorge Pérez Gutiérrez
TUTOR/A:	D.ª María Puertas Bartolomé D. Sergio Acosta Rodríguez
DEPARTAMENTO:	Departamento de Química Orgánica

TRIBUNAL

PRESIDENTE:	D.ª María Mercedes Santos García
SECRETARIO:	D. Sergio Acosta Rodríguez
VOCAL:	D.ª María Puertas Bartolomé
SUPLENTE 1:	D. Israel González de la Torre
SUPLENTE 2:	D.ª Matilde Alonso Rodríguez

FECHA: 4 Septiembre 2025

CALIFICACIÓN:

ÍNDICE

1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	7
2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	9
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. BIOIMPRESIÓN 3D	11
3.1.1. BIOTINTAS PARA LA IMPRESIÓN 3D	11
3.1.1.1. HIDROGELES GRANULARES PARA LA FORMULACIÓN DE BIOTINTAS	12
3.2. POLÍMEROS RECOMBINANTES TIPO ELASTINA	13
3.2.1. ELASTINA	13
3.2.2. RECOMBINÁMEROS TIPO ELASTINA (ELRs)	13
4. OBJETIVOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. MATERIALES	16
5.1.1. REACTIVOS Y EQUIPOS EMPLEADOS	16
5.1.2. ELRs EMPLEADOS	17
5.2. METODOLOGÍA	19
5.2.1. FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ELRs	19
5.2.1.1. REACCIÓN DE MODIFICACIÓN DE LOS ELRs	19
5.2.1.2. PURIFICACIÓN	20
5.2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS ELRs FUNCIONALIZADOS	21
5.2.2.1. RMN	21
5.2.2.2. MALDI-TOF	22
5.2.3. PREPARACIÓN DE MICROGELES BASADOS EN ELRs	23
5.2.3.1. PREPARACIÓN DE LOS MICROGELES MEDIANTE LA TÉCNICA DE EMULSION BATCH	23
5.2.3.2. PURIFICACIÓN DE LOS MICROGELES	24
5.2.3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MICROGELES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA	26
5.2.4. ESTUDIO DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS	26
5.2.4.1. PREPARACIÓN DE LA TINTA: ESTUDIO DEL JAMMING	26
5.2.4.2. PRUEBA DE INYECTABILIDAD DE LA TINTA	27
5.2.4.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE IMPRESIÓN CON MATERIAL MODELO	28
5.2.4.4. ESTUDIO DE LA VENTANA DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS	30

6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
6.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS ELRs FUNCIONALIZADOS 32	
6.1.1.	RMN	32
6.1.2.	MALDI-TOF	34
6.2.	PREPARACIÓN DE MICROGELES BASADOS EN ELRs	38
6.2.1.	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MICROGELES.....	38
6.3.	ESTUDIO DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS	40
6.3.1.	PREPARACIÓN DE LA TINTA. ESTUDIO DEL JAMMING	40
6.3.2.	PRUEBA DE INYECTABILIDAD DE LA TINTA	42
6.3.3.	OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE IMPRESIÓN CON MATERIAL MODELO	43
6.3.4.	ESTUDIO DE LA VENTANA DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS	46
7.	CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS.....	53
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Polímeros empleados (HRGD6 y VKV24) para el TFG, liofilizados.	18
Figura 2: Sistema de jeringas acopladas	24
Figura 3: Centrifuga con la que se realizaron el lavado y jamming de los microgeles.	25
Figura 4: Interfaces del software de impresión de la impresora 3D Regemat.....	29
Figura 5: Imagen de la impresora 3D Regemat con la jeringa ya montada, que contiene los microgeles ya preparados para imprimir	31
Figura 6: Espectro RMN del polímero VKV24 modificado	32
Figura 7: Espectro RMN del polímero HRGD6 modificado.....	33
Figura 8: Maldi-TOF HRGD6 sin modificar.....	34
Figura 9: Maldi-TOF VKV24 sin modificar	35
Figura 10: Maldi-TOF HRGD6 modificado con N3	36
Figura 11: Maldi-TOF VKV24 modificado con CC	37
Figura 12: Imágenes de microscopía óptica a misma escala de los microgeles de una misma muestra en fase oleosa con el objetivo 10x. La imagen de la izquierda se corresponde a la tomada antes de la purificación, y la de la izquierda tras la misma.	38
Figura 13: Histogramas de las medidas realizadas a los diámetros de las esferas de los microgeles: El de arriba se corresponde a antes de su purificación, y el de abajo tras la misma.	39
Figura 14: Microgeles sin compactar en medio acuoso tras realizar el jamming a 18.516 G.....	40
Figura 15: Aspecto de los microgeles en medio de cultivo tras el jamming realizado a 2500 G.....	41
Figura 16: Aspecto de los microgeles tras haber realizado el jamming a 3000 G y recogerlos con una espátula.	42
Figura 17: Realización de la prueba manual a 3500 G y aguja de 20 Gauge, comprobando la inyectabilidad de los microgeles sobre una placa Petri.	43
Figura 18: Diseño de una sola capa impreso con crema Nivea con una flow speed de 1.0 mm/s, una infill speed de 1,5 mm/s, una layer height de 0,3 mm, una bed temperatura de 25°C, una travel speed de 99 mm/s y un diámetro de la aguja de 0,25 mm/s.....	44
Figura 19: Varios diseños de una sola capa impresos sobre papel con crema Nivea con unos parámetros fijos de infill speed de 1,2mm/s, layer height de 0,2 mm, bed temperatura de 25°C, travel speed de 99 mm/s y diámetro de la aguja de 0,25 mm/s. En este caso, se fue variando la flow speed: A) 0,2 mm/s, B) 0,4 mm/s, C) 0,6 mm/s, D) 0,5 mm/s, E) 0,8 mm/s, F) 0,7 mm/s.	45
Figura 20: Diseño de 20 capas impreso con crema Nivea sobre un pocillo tras la optimización final de parámetros, que son: flow speed de 0,1mm/s, una infill speed de 1,3 mm/s, una layer height de 0,15 mm, una bed temperatura de 25°C, una travel speed de 99 mm/s y un diámetro de la aguja de 0,25 mm/s.	46
Figura 21: Ajuste de los parámetros de impresión en la ventana Scaffold de la impresora 3D Regemat.....	47
Figura 22: Heatmap que muestra los resultados del estudio de la ventana de printabilidad variando los parámetros de infill y flow speed.	49
Figura 23: Imágenes del estudio de la printabilidad de los microgeles. (A) Flow speed 8.0 e infill speed 1.5. (B) Flow speed 9.0 e infill speed 1.5. (C) Flow speed 9.0 e infill speed 1.0. (D) Flow speed 9.5 e infill speed 1.0. (E) Flow speed 9.7 e infill speed 1.5.	

(F) Flow speed 10.0 e infill speed 1.2. (G) Flow speed 10.5 e infill speed 1.6. (H) Flow speed e infill speed 11.5 y 2.0.....	50
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Reactivos empleados	16
Tabla 2: Disolventes empleados	17
Tabla 3: Equipos empleados	17
Tabla 4: ELRs empleados	18
Table 5: Tabla resumen de las reacciones llevadas a cabo	19
Table 6: Resultados obtenidos para las reacciones de los polímeros modificados	33
Table 7: Pesos moleculares polímeros sin modificar y polímeros modificados	34
Tabla 8: Resultados obtenidos para las reacciones del HRGD6 y del VKV24	37
Table 9: Parámetros de Scaffold empleados en la impresora 3D	46
Tabla 10: Parámetros de Filling empleados en la impresora 3D.....	47
Tabla 11: Parámetros de Extra Configuration empleados en la impresora 3D	47
Tabla 12: Variación de los parámetros de flow speed e infill speed de la impresora 3D Regemat con sus resultados asociados.....	49

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1: Porcentaje aminos modificadas RMN	22
Ecuación 2: Aminos modificadas Maldi-TOF	22

1. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

ECM - Matriz extracelular.

Eq – Equivalentes.

ELRs – Elastin-like recombinamers (Recombinámeros tipo elastina).

LAP – Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate.

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (espectrometría de masas, desorción/ionización láser asistida por matriz).

Mod – Modificado.

MQ - Agua Milli-Q (destilada ultrapura).

NHS - N-Hydroxysuccinimide.

NM – No Modificado.

P – Peso.

Pm – Peso molecular.

Ppm – partes por millón.

RMN – Resonancia magnética nuclear.

T – Temperatura.

TFG – Trabajo de Fin de Grado.

2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

RESUMEN

En los últimos años, la bioimpresión 3D se ha consolidado como una de las herramientas más prometedoras dentro de la ingeniería de tejidos, al permitir la fabricación de constructos biológicos complejos a partir de biotintas. Sin embargo, uno de los principales retos que persisten es el desarrollo de biotintas que reúnan unas propiedades mecánicas, reológicas y biológicas adecuadas para imitar de manera eficaz el comportamiento de los tejidos nativos. En este contexto, los hidrogeles granulares han surgido como una alternativa capaz de solventar algunas de las limitaciones de los hidrogeles en bloque, gracias a su porosidad micrométrica, su capacidad de autorreparación y su comportamiento *shear-thinning*, lo que los convierte en candidatos idóneos para bioimpresión por extrusión.

Dentro del desarrollo de biomateriales avanzados, los recombinámeros tipo elastina (ELRs) han demostrado ser altamente versátiles y biocompatibles, permitiendo un control preciso de sus propiedades mediante modificaciones químicas específicas. En este Trabajo de Fin de Grado se planteó la optimización de una biotinta basada en microgeles compactados de ELRs, evaluando tanto sus características fisicoquímicas como su comportamiento en bioimpresión 3D.

El trabajo comenzó con la funcionalización química de dos ELRs: HRGD₆, modificado con grupos azida, y VKV₂₄, modificado con grupos ciclooctino. Para confirmar el éxito de las reacciones se aplicaron técnicas de caracterización como resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas MALDI-TOF, que permitieron calcular el grado de modificación alcanzado en los residuos de cada polímero. Posteriormente, ambos polímeros modificados se emplearon en la formación de microgeles mediante la técnica *emulsion batch*, seguidos de un proceso de purificación y análisis morfológico mediante microscopía óptica.

Una vez obtenidos los microgeles, se llevó a cabo un estudio de printabilidad basado en distintas fases: el análisis del *jamming* para identificar las condiciones óptimas de compactación, pruebas de inyectabilidad manual para comprobar la cohesión y fluidez del material, la optimización preliminar de parámetros de impresión utilizando material modelo, y la definición de una ventana de printabilidad de los microgeles compactados en la impresora 3D Regemat. Estos ensayos permitieron establecer las condiciones más adecuadas de extrusión y deposición para este tipo de biotinta.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que los hidrogeles granulares basados en ELRs funcionalizados poseen propiedades estructurales adecuadas para ser utilizados como biotintas en bioimpresión 3D. Su combinación de modularidad, biocompatibilidad y capacidad de ser procesados en forma de microgeles compactados refuerza su potencial como plataforma versátil para aplicaciones en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

PALABRAS CLAVES

Bioimpresión 3D, Biotintas, Hidrogeles granulares, Microgeles, Recombinámeros tipo elastina, Printabilidad, Ingeniería de tejidos, Medicina regenerativa.

ABSTRACT

In recent years, 3D bioprinting has emerged as one of the most promising tools in tissue engineering, enabling the fabrication of complex biological constructs using bioinks. However, one of the main challenges that still remains is the development of bioinks with suitable mechanical, rheological, and biological properties to effectively mimic the behavior of native tissues. In this context, granular hydrogels have arisen as an alternative capable of overcoming some of the limitations of bulk hydrogels, thanks to their micrometric porosity, self-healing ability, and shear-thinning behavior, which makes them ideal candidates for extrusion-based bioprinting.

Within the field of advanced biomaterials, elastin-like recombinamers (ELRs) have proven to be highly versatile and biocompatible, allowing precise control over their properties through specific chemical modifications. In this Bachelor's Thesis, the optimization of a bioink based on compacted ELR microgels was proposed, evaluating both their physicochemical characteristics and their performance in 3D bioprinting.

The work began with the chemical functionalization of two ELRs: HRGD6, modified with azide ($-N_3$) groups, and VKV24, modified with cyclooctyne groups. To confirm the success of these reactions, characterization techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR) and MALDI-TOF mass spectrometry were applied, allowing the degree of modification of residues in each polymer to be determined. Subsequently, the modified polymers were used to produce microgels through the emulsion batch technique, followed by purification and morphological analysis using optical microscopy.

Once the microgels were obtained, a printability study was conducted in several phases: jamming analysis to identify the optimal compaction conditions, manual injectability tests to assess the cohesion and flow of the material, preliminary optimization of printing parameters using a model material, and the definition of a printability window for the compacted microgels in the Regemat 3D bioprinter. These tests allowed the establishment of the most suitable conditions for extrusion and deposition of this type of bioink.

Overall, the results obtained demonstrate that granular hydrogels based on functionalized ELRs exhibit suitable structural properties to be used as bioinks in 3D bioprinting. Their combination of modularity, biocompatibility, and processability in the form of compacted microgels highlights their potential as a versatile platform for applications in tissue engineering and regenerative medicine.

KEYWORDS

3D Bioprinting, Bioinks, Granular Hydrogels, Microgels, Elastin-like Recombinamers, Printability, Tissue Engineering, Regenerative Medicine.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. BIOIMPRESIÓN 3D

La **bioimpresión 3D** se ha consolidado en los últimos años como una de las tecnologías más disruptivas en el ámbito de la **ingeniería de tejidos** y la **medicina regenerativa**, ya que ofrece la posibilidad de construir estructuras tridimensionales con un control espacial muy preciso de células, biomateriales y señales bioquímicas [1], [2], [3], [4]. A diferencia de otras técnicas de fabricación aditiva, la bioimpresión permite reproducir arquitecturas biológicas complejas con una fidelidad estructural que favorece la recreación de funciones específicas del tejido nativo. Gracias a ello, ha sido posible fabricar constructos con geometrías vasculares, cartílagos de formas personalizadas e incluso modelos in vitro de órganos, contribuyendo a la llamada medicina personalizada [5], [6].

El impacto de esta tecnología se extiende más allá de la regeneración de tejidos dañados: se ha demostrado su potencial en la generación de modelos de enfermedad, la toxicología preclínica y la evaluación de fármacos, con una capacidad de predicción mucho mayor que los modelos animales o 2D tradicionales [7]. De hecho, el uso de bioimpresión 3D en sistemas tissue-on-chip ha permitido reproducir gradientes químicos y microarquitecturas fisiológicas, aportando un entorno más realista para el estudio celular [8].

Existen distintas modalidades de bioimpresión, como la inyección por chorro (inkjet), la basada en láser y la bioextrusión. Cada una presenta ventajas y limitaciones en términos de resolución, velocidad, tipos de biotintas procesables y efectos sobre la viabilidad celular [9]. En el caso de la bioextrusión, técnica empleada en este TFG, la principal ventaja radica en su versatilidad para procesar hidrogeles de distinta naturaleza, incluidas formulaciones de alta densidad celular y biotintas viscosas. Además, se ha consolidado como una plataforma escalable y adaptable a distintos diseños [10], [11].

3.1.1. BIOTINTAS PARA LA IMPRESIÓN 3D

No obstante, uno de los principales retos que persisten es la selección y desarrollo de biotintas adecuadas. El equilibrio entre imprimibilidad (printability) y funcionalidad biológica sigue siendo difícil de alcanzar. Biotintas demasiado fluidas o blandas facilitan la supervivencia celular, pero no mantienen la forma impresa; por el contrario, biotintas con elevada viscosidad y rigidez aseguran estabilidad geométrica, pero comprometen la viabilidad celular debido a las fuerzas de extrusión [12], [13], [14].

Las propiedades clave que debe reunir una biotinta ideal para bioimpresión por extrusión incluyen:

- **Biocompatibilidad** y no toxicidad.
- **Viscoelasticidad** con comportamiento shear-thinning pronunciado.
- **Tensión de cedencia** suficiente para soportar estructuras multicapa.
- **Recuperación rápida** tras el cizallamiento.
- **Auto-curación/tixotropía**, para favorecer la unión entre filamentos [15], [16], [17], [18].

Además, cada biotinta debe ser adaptable a los requerimientos del tejido específico a regenerar. Esto implica no solo controlar la mecánica y la reología, sino también introducir señales bioquímicas para guiar la diferenciación celular y permitir la remodelación del constructo [19]. En este contexto, se han desarrollado estrategias como las biotintas bio-ortogonales (que permiten reticulaciones bajo condiciones fisiológicas sin agentes tóxicos) [20], las aproximaciones UNION biotintas que integran diferentes polímeros en una misma red ortogonal [21] y la impresión mediante precursores foto-reticulables no viscosos que se estabilizan in situ durante la deposición [22]. Estas innovaciones reflejan la búsqueda de biotintas que no solo sean imprimibles, sino que también favorezcan la viabilidad y funcionalidad celular a largo plazo.

3.1.1.1. HIDROGELES GRANULARES PARA LA FORMULACIÓN DE BIOTINTAS

Los **hidrogeles** han sido la base de la mayoría de biotintas desarrolladas hasta la fecha debido a su similitud con la matriz extracelular y su elevado contenido en agua, que proporciona un entorno favorable para la supervivencia celular [1], [2], [3]. Son materiales blandos, versátiles y fácilmente funcionalizables con péptidos bioactivos o factores de crecimiento. Sin embargo, los **hidrogeles en bloque (bulk)** presentan limitaciones críticas. Su porosidad nanométrica restringe la infiltración celular y la difusión de nutrientes, dificultando la vascularización y la maduración de los tejidos impresos [5], [6]. Además, su baja resistencia mecánica limita su uso en aplicaciones sometidas a tensiones fisiológicas, y su estrecha ventana reológica dificulta alcanzar simultáneamente fidelidad de impresión y viabilidad celular [7], [8].

Para superar estas limitaciones surgió la estrategia de los hidrogeles granulares, formados por el empaquetamiento denso de microgeles hasta alcanzar un estado jammed [9], [10]. Estos sistemas exhiben un comportamiento característico: son sólidos a bajas tensiones, lo que asegura la estabilidad estructural, pero fluyen bajo cizalla, lo que facilita la extrusión [11]. Tras la impresión, recuperan rápidamente su estructura, permitiendo la conservación de la forma. Además, presentan microporosidad interconectada que facilita la migración celular y la difusión de nutrientes [12], [13], [14].

La flexibilidad de esta aproximación radica en la modularidad de los microgeles: pueden diseñarse con distintas composiciones, rigideces y biofuncionalizaciones, y combinarse para crear matrices híbridas con funciones complementarias [15]. Se ha demostrado que el método de fabricación (microfluídica, emulsión, fragmentación, microstrands) impacta en la forma, el tamaño y, por ende, en las propiedades reológicas del hidrogel granular [16]. Incluso se han diseñado microgeles que conservan microporosidad interconectada tras el empaquetamiento, lo que potencia la infiltración celular [17].

Más allá de actuar como biotintas directas, los hidrogeles granulares se han empleado como materiales de soporte para impresión embebida y fabricación 4D. Por ejemplo, se han utilizado como baños que guían la maduración de constructos y permiten generar materiales “shape-morphing” con capacidad de cambiar de forma tras la impresión [18].

De manera complementaria, se han desarrollado sistemas autoensamblables basados en péptidos, capaces de formar nanofibras mediante interacciones no covalentes [19] [23]. Estos hidrogeles presentan propiedades tixotrópicas y de auto-curación, útiles para bioextrusión [20]. Ejemplos más recientes incluyen la creación de biotintas interfaciales autoensamblables, como los basados en ELRs y grafeno oxidado, que permiten fabricar estructuras capilar-like con paredes de micras y permeabilidad ajustable [21]. Estas innovaciones muestran cómo el campo se orienta hacia sistemas

dinámicos, jerárquicos y bioestructivos que superan las limitaciones de los hidrogeles bulk.

3.2. POLÍMEROS RECOMBINANTES TIPO ELASTINA

3.2.1. ELASTINA

La elastina es un componente estructural clave de la MEC en tejidos elásticos (arterias de gran calibre, pulmón, piel), donde confiere resiliencia y recuperación elástica tras deformaciones cíclicas [18], [19]. Su comportamiento macroscópico surge de una arquitectura jerárquica: la tropoelastina secretada por las células se organiza en fibras mediante procesos de entrecruzamiento y ensamblaje supramolecular, generando redes duraderas que soportan millones de ciclos de carga a lo largo de la vida del tejido [18].

No obstante, emplear elastina natural como biomaterial presenta limitaciones: extracción compleja, variabilidad entre lotes y escasa maniobrabilidad química para dotarla de funciones específicas [19]. Esta problemática motivó el desarrollo de materiales bioinspirados que retuvieran la funcionalidad elástica pero con control molecular y reproducibilidad: los **Elastin-like Recombinamers (ELRs)** [13], [14], [15], [19], [20].

3.2.2. RECOMBINÁMEROS TIPO ELASTINA (ELRs)

Inspirados en ella, se desarrollaron los ELRs, polímeros recombinantes basados en repeticiones del pentapéptido VPGXG [13], [14]. Los ELRs poseen una transición de fase inversa (ITT) dependiente de la temperatura, que les permite pasar de estado soluble a autoensamblado en condiciones fisiológicas [14], [15]. Esta propiedad, junto con su modularidad estructural, permite incorporar dominios bioactivos (RGD, secuencias sensibles a proteasas, péptidos angiogénicos) y ajustar propiedades mecánicas, de degradación y de bioactividad [15], [20].

En los últimos años, se han desarrollado múltiples variantes:

- **ELRs funcionalizados con química CLICK sin catalizador**, que forman hidrogeles bajo condiciones fisiológicas sin necesidad de metales [19] [24].
- **Co-recombinamers anfifílicos con *leucine zippers***, que generan hidrogeles más estables gracias a la cooperación entre dominios estructurales [20].
- **ELRs con densidad de carga controlada**, capaces de modular el autoensamblaje jerárquico y generar arquitecturas supramoleculares [21].
- **ELRs biofuncionalizados con péptidos miméticos de VEGF y secuencias proteolíticas**, que permiten guiar la angiogénesis espaciotemporal en entornos tridimensionales [25], [26].

Estas aproximaciones demuestran que los ELRs superan a otros biomateriales como colágeno, gelatina o PEG en aspectos clave: reproducibilidad de síntesis, versatilidad funcional, biocompatibilidad y control molecular. Además, su producción recombinante asegura homogeneidad y ausencia de riesgos inmunológicos.

Es por ello que los ELRs se perfilan como materiales prometedores para la formulación de biotintas, al combinar biomimética, versatilidad y estabilidad [13], [14], [15], [22]. El objetivo general de este TFG es formular y caracterizar biotintas basadas en microgeles de ELRs para bioimpresión por extrusión, evaluando sus propiedades mecánicas, reológicas y biológicas, apoyándose en las ventajas combinadas de ambos enfoques. Se espera la integración de ELRs en arquitecturas granulares, permita solventar las limitaciones de los hidrogeles bulk, dando lugar a biotintas con excelente imprimibilidad y funcionalidad biológica.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFG es optimizar una formulación de biotinta basada en hidrogeles granulares de ELRs para su potencial aplicación en regeneración de tejidos. En particular, este proyecto se integra dentro de una línea de investigación del grupo Bioforge centrada en el desarrollo y caracterización de biotintas, analizando su posterior aplicabilidad en la ingeniería de tejidos. Para ello, se evaluaron diversas formulaciones de microgeles compactados basados en ELRs, estudiando detalladamente sus propiedades fisicoquímicas, printabilidad y viabilidad.

Los objetivos específicos de este TFG son los siguientes:

- Modificación química de los ELRs: se llevaron a cabo procesos de funcionalización selectiva sobre los polímeros de partida (HRGD6 y VKV24), dando lugar a los derivados modificados HRGD6-N₃ y VKV-CC, con el fin de dotar a los polímeros de grupos reactivos que permitan su posterior entrecruzamiento. Esta etapa incluye su verificación y caracterización mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MALDI-TOF).
- Formación, purificación y caracterización de los microgeles: se produjeron microgeles mediante la técnica *emulsion batch*, empleando los ELRs previamente modificados. Posteriormente, se llevaron a cabo su purificación, caracterización mediante microscopía óptica y análisis de distribución de tamaño.
- Jamming, evaluación de parámetros de impresión con material modelo y estudio de ventana de printabilidad con los microgeles: se determinarán los parámetros óptimos de jamming de los microgeles, así como los de impresión en bioimpresión 3D, analizando la capacidad de la formulación seleccionada para mantener su integridad estructural y garantizar una extrusión homogénea desde la impresora.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta sección detalla los materiales de laboratorio, reactivos y disolventes empleados a lo largo del desarrollo experimental del presente trabajo. Asimismo, se describen los métodos utilizados en el laboratorio y los procedimientos seguidos en cada una de las etapas, desde la preparación inicial hasta la caracterización final de los compuestos.

5.1. MATERIALES

En esta sección se presentan todos los materiales de laboratorio empleados, incluyendo tanto materiales reutilizables como desechables. Cabe destacar que todos los reactivos utilizados fueron adquiridos a proveedores comerciales reconocidos, con el fin de garantizar la calidad y la fiabilidad de los productos empleados en los distintos procedimientos experimentales.

5.1.1. REACTIVOS Y EQUIPOS EMPLEADOS

A continuación, se presenta un resumen de todos los materiales y reactivos empleados durante la realización del presente TFG. En la Tabla 1 se enumeran específicamente los reactivos utilizados, junto con sus principales características y proveedores.

REACTIVO	PROVEEDOR
Solución salina tampón (PBS)	Gibco
(1R,8S,9s)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl N-succinimidyl carbonate (NHS-CC)	ALDRICH
2-Azidoethyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) carbonate (NHS-N3)	ALDRICH

Tabla 1: Reactivos empleados

En la Tabla 2 se recogen los disolventes utilizados en el trabajo:

DISOLVENTE	PROVEEDOR
Agua destilada	BIOFORGE
Agua ultrapura (MQ)	BIOFORGE
Etanol	Scharlab
Dimetil sulfóxido deuterado (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dimetilformamida (DMF)	Scharlab

Dietil éter	Thermo Scientific Chemicals
-------------	-----------------------------

Tabla 2: Disolventes empleados

En la Tabla 3 se recogen los aparatos utilizados en el trabajo:

EQUIPO	CASA COMERCIAL
Impresora 3D	REGEMAT
Centrífuga	Thermo Fisher
Campana de flujo laminar	Telstar
Balanza	Mettler Toledo
Microscopio óptico	Nikon

Tabla 3: Equipos empleados

También se hizo uso de material de laboratorio tanto desechable como reutilizable. Entre los elementos empleados se incluyen: agujas, tubos Eppendorf, tubos Falcon, guantes, jeringas, parafilm, pipetas, micropipetas, membranas de diálisis, pipetas Pasteur, papel de aluminio, botes para liofilización, pinzas, embudos, placas Petri, vasos de precipitados, frascos, tubos para RMN, pH-metro, balanza, mechero, cronómetros, termohigrómetro, estufa, congelador, frigorífico, máquina de hielo, agitadores, entre otros.

El material no desechable fue lavado cuidadosamente siguiendo un protocolo establecido, que incluye lavados sucesivos con jabón, agua corriente, agua destilada y agua ultrapura (MQ), con el fin de garantizar su correcta reutilización en el Bioforge.

5.1.2. ELRs EMPLEADOS

Los ELRs empleados en este Trabajo de Fin de Grado fueron diseñados y proporcionados por el grupo BIOFORGE y obtenidos mediante tecnología de ADN recombinante, utilizando bacterias *Escherichia coli* como sistema de expresión. La purificación de los ELRs se realiza mediante ciclos de segregación reversible termo-dependiente, aprovechando la temperatura de transición inversa característica de estos polímeros. Posteriormente, los ELRs son sometidos a un proceso de diálisis con agua ultrapura a una temperatura aproximada de 4 °C. Posteriormente, se filtran, se congelan y se liofilizan, conservándose a baja temperatura hasta su uso.

En la siguiente tabla se recogen los ELRs utilizados en este estudio, incluyendo su abreviatura, secuencia de aminoácidos, número de residuos de lisina (K) y peso molecular teórico (Pm):

ABREVIATURA	HRGD ₆	VKV ₂₄
-------------	-------------------	-------------------

AAs	MGSSHHHHHHSSGLVPR GSHMESLLP {[(VPGIG)2(VPGKG)(VPGI G)2]2AVTGRGDSPASS[(V PGIG)2(VPGKG)(VPGIG)2] 2}6	MESLLPVGVPGVG [VPGKG(VPGVG) ₅] ₂₃ VPGKGVPGVGVPGVG VPGVGVPGV
K	24	24
Pm (kDa)	60,65	60,45

Tabla 4: ELRs empleados

El polímero **VKV₂₄** es un biopolímero que contiene 24 lisinas con un peso molecular teórico de 60,45 kDa.

El polímero **HRGD₆** es un biopolímero que contiene 24 lisinas en su estructura, con un peso molecular teórico de unos 60,65 kDa. Está basado en la repetición del monómero VPGIG y contiene la secuencia RGD, secuencia bioactiva, que promueve la adhesión celular (arginina, glicina y ácido aspártico).

Para la realización de los distintos experimentos, se utilizó el polímero en su forma liofilizada pura. En este estado, el material presenta un aspecto algodonoso y blanquecino, tal como se muestra en la ilustración X.

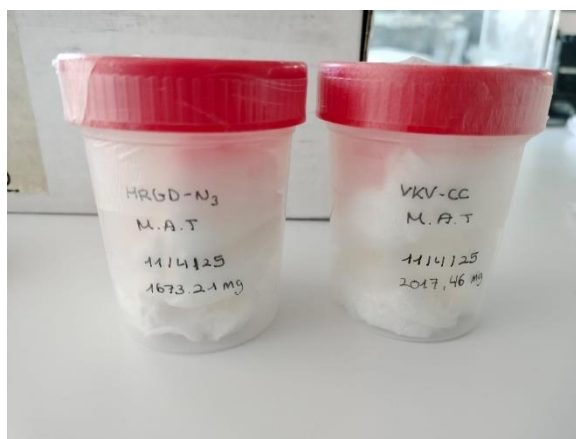


Figura 1: Polímeros empleados (HRGD6 y VKV24) para el TFG, liofilizados.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ELRs

5.2.1.1. REACCIÓN DE MODIFICACIÓN DE LOS ELRs

Se modificaron químicamente los ELRs HRGD₆ y VKV₂₄. El objetivo de esta reacción es introducir en las cadenas de los ELRs grupos funcionales complementarios que permitan su posterior entrecruzamiento mediante una reacción bio-ortogonal sin necesidad de catalizadores, conduciendo así a la formación de una red de hidrogel.

La modificación se lleva a cabo a través de una reacción de amidación, en la que los grupos amina presentes en la estructura de los polímeros (en los aminoácidos lisinas, y el terminal) reaccionan con derivados activados con N-hidroxisuccinimida (NHS). En el caso del polímero VKV₂₄, se emplea NHS-CC, incorporando grupos ciclooctino reactivos; mientras que en el HRGD₆ se utiliza NHS-N₃, incorporando grupos azida (-N₃).

En ambos casos, la cantidad de reactivo se calculó para que correspondiera aproximadamente al 60 % de los grupos amina disponibles en cada ELR, lo que corresponde a un máximo teórico de 15 grupos funcionalizados. Esta proporción se estableció de forma deliberada como estrategia de control de la reacción, con el objetivo de evitar la sobrefuncionalización de la cadena polimérica, lo que podría alterar de forma significativa sus propiedades físico-químicas (solubilidad, flexibilidad y temperatura de transición).

Se llevaron a cabo las reacciones, cuyos datos vienen recogidos en la siguiente tabla:

REACCIÓN	POLÍMERO	MASA DEL POLÍMERO (mg)	REACTIVO	MASA DEL REACTIVO (mg)	CONCENTRACIÓN POLÍMERO EN DMF (mg/mL)	EQUIVALENTES	TEMPERATURA
1	VKV ₂₄	1175,7	NHS-CC	84,982	20	0,6	rt
2	VKV ₂₄	2201,4	NHS-CC	159,121	20	0,6	rt
3	HRGD ₆	1342,7	NHS-N ₃	75,770	20	0,6	rt
4	HRGD ₆	1868,8	NHS-N ₃	105,459	20	0,6	rt

Table 5: Tabla resumen de las reacciones llevadas a cabo

El proceso general tanto para el VKV como para el HRGD es el siguiente:

- 1. Pesado del polímero:** Se pesa la cantidad deseada de polímero en estado liofilizado utilizando una balanza analítica. En caso de trabajar con el lote

completo, se reserva una pequeña fracción para futuros análisis. El polímero se introduce en un matraz de fondo redondo equipado con un agitador magnético.

2. **Desgasificación del sistema:** El aire contenido en el matraz se sustituye por atmósfera inerte (nitrógeno) mediante el uso de globos conectados con agujas. Este proceso se repite dos veces para garantizar un entorno libre de oxígeno y humedad, evitando así reacciones colaterales no deseadas.
3. **Disolución del polímero:** El polímero se disuelve en dimetilformamida (DMF) anhidro empleando una proporción de 20 mL por gramo de polímero. Se mantiene la agitación magnética constante para asegurar una disolución homogénea durante al menos media hora o hasta que se disuelva por completo.
4. **Cálculo del reactivo:** Se determina el número total de grupos amina presentes en la cadena del polímero, y se calcula la cantidad de reactivo (derivado de azida o de ciclooctino) necesaria para alcanzar el 60% de grado de modificación. Este cálculo se basa en el peso molecular del polímero y del reactivo.
5. **Adición del reactivo:** El reactivo se disuelve por separado en 1–2 mL de disolvente (DMF) y se añade lentamente al matraz que contiene el polímero disuelto, bajo agitación constante, para facilitar la difusión y reacción homogénea de los componentes.
6. **Reacción:** La mezcla se deja reaccionar bajo agitación constante durante un periodo de 24 horas, a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C).

5.2.1.2. PURIFICACIÓN

El proceso de purificación prosigue de la siguiente manera:

7. **Precipitación del polímero modificado:** Se extraen alícuotas de la reacción (8–10 mL) y se transfieren a tubos Falcon. El matraz se enjuaga con una pequeña cantidad de disolvente para recuperar el material restante. A continuación, se añade dietil-éter frío hasta alcanzar un volumen de 40 mL por tubo. Se agita suavemente para facilitar la precipitación del polímero.
8. **Centrifugación:** Las muestras se centrifugan a $15\,000 \times g$ durante 20 minutos a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se lava con acetona fría y se centrifuga nuevamente a $17\,000 \times g$ durante 35–40 minutos. Este paso se repite dos veces para eliminar restos de disolvente y reactivos no reaccionados.
9. **Secado inicial:** Se retira el sobrenadante final y los tubos se dejan abiertos, cubiertos con Parafilm perforado, durante 24 horas en una cámara de vacío para favorecer la evaporación de disolventes residuales.
10. **Rehidratación:** Los pellets obtenidos se disuelven en 15–20 mL de agua ultrapura (MQ) en cámara fría y se agitan durante otras 24 horas para asegurar la disolución completa del polímero modificado.
11. **Diálisis:** La solución resultante se introduce en una tripa de diálisis (dejando al menos un 25 % de volumen libre) y se sumerge en un bidón con agua ultrapura bajo agitación constante. Se cambia el medio dializante a las 24 horas, repitiendo el proceso durante un total de 3 días.

12. Filtración y liofilización: El contenido de la tripa se extrae utilizando un sistema de filtración con embudo de cafetera sobre hielo (tamaño de poro 0,2 μm). Se realiza un lavado final del interior de la tripa, y todo el contenido se filtra al vacío. Finalmente, la solución purificada se congela y se somete a liofilización para obtener el polímero modificado en estado seco y listo para su uso experimental.

5.2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS ELRs FUNCIONALIZADOS

Para caracterizar los polímeros modificados se utilizan dos técnicas: resonancia magnética nuclear (RMN) y fragmentación por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF).

5.2.2.1. RMN

La RMN de protón es una técnica analítica clave para el análisis estructural y la determinación de la composición química de compuestos orgánicos.

En este trabajo, el análisis de RMN se realiza en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid (UVA). La muestra se prepara disolviendo aproximadamente 5 mg de polímero en 0,6 mL de DMSO deuterado (DMSO-d_6) dentro de un tubo de vidrio específico para RMN. El equipo empleado para los análisis es un espectrómetro Agilent Technologies NMR 400, capaz de operar a 400 MHz para el núcleo de protón (^1H), proporcionando alta resolución y sensibilidad. El procesamiento de los espectros se lleva a cabo utilizando el software especializado MestReNova.

La espectroscopía de RMN, además de permitir la identificación estructural de los compuestos obtenidos, resulta especialmente útil para la determinación del grado de modificación en las reacciones descritas anteriormente. Tras la adquisición de los datos, se obtiene un espectro que proporciona información detallada sobre la estructura molecular de la muestra, basada en la absorción de radiofrecuencia como función del desplazamiento químico.

Los principales parámetros analizados en un espectro de RMN son:

- Desplazamiento químico (δ , en ppm): Corresponde a la posición de las señales en el espectro. Estas posiciones se comparan con valores tabulados que permiten identificar grupos funcionales y entornos químicos característicos de los átomos de hidrógeno en la molécula. En el presente TFG, hemos analizado los ppm 1, de 1.7 a 1.8, de 2.0 a 2.7, de 3.5 a 4.5 y 8, que corresponden a los protones metilos de cadenas laterales alifáticas, a metilenos internos de cadenas laterales, a alifáticos próximos a carbonilo, a los α -protones de los aminoácidos y a los protones aromáticos (amidas), respectivamente.
- Integración: Representa el área bajo las señales. El área de cada pico es proporcional al número de núcleos de hidrógeno que generan esa señal específica.

A través del análisis combinado del desplazamiento químico y de la integración de los picos, es posible realizar una descripción precisa de los polímeros, así como de las modificaciones estructurales introducidas. En particular, al integrar las nuevas

señales surgidas en el espectro del polímero modificado, es posible determinar cuantitativamente los protones asociados a la reacción de modificación.

Concretamente, para ambos polímeros, VKV-CC y HRGD6-N₃, aparece una nueva señal característica a 7.1–7.2 ppm. Este pico, ausente en los polímeros sin modificar, permite identificar la reacción ocurrida y, mediante su integración, cuantificar el número de grupos amina modificados en cada polímero.

$$\%Grado_{mod\ RMN} = \frac{aminas_{integral}}{total_{aminas}} \times 100$$

Ecuación 1: Porcentaje aminos modificadas RMN

5.2.2.2. MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica clave para determinar con alta precisión el peso molecular de polímeros de gran tamaño. Combina una ionización suave (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) con un análisis por tiempo de vuelo (*Time-of-Flight*), lo que permite preservar la integridad estructural del analito.

En el presente trabajo, los análisis MALDI-TOF fueron realizados empleando un espectrómetro Bruker Autoflex y un Voyager-DE Instrument de PE Biosystems, ambos equipados con un láser de nitrógeno de 337 nm. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales del Parque Tecnológico de la Universidad de Valladolid. Para cada análisis, se preparó una muestra de aproximadamente 3 mg de polímero, pesada en un tubo Eppendorf, que fue entregada en el laboratorio tras cumplimentar la correspondiente solicitud de servicio.

Mediante esta técnica se determina el peso molecular tanto del polímero sin modificar como del polímero modificado, lo que permite calcular el porcentaje de sustitución de aminos a partir de la diferencia de pesos moleculares entre los espectros obtenidos. La información proporcionada por esta técnica, permite cuantificar el grado de modificación química alcanzado tras la reacción, utilizando la siguiente ecuación:

$$aminas_{mod} = \frac{\Delta PM}{PM_{grupo\ introducido}}$$

Ecuación 2: Aminos modificadas Mald-TOF

El NHS (con un peso molecular de 115,09 g/mol), que actúa como un grupo saliente, será eliminado del compuesto final. Sabemos que el NHS-N3 cuenta con un peso molecular de 228,17 g/mol según las especificaciones del producto, mientras que el NHS-CC cuenta con uno de 291,3 g/mol. Si restamos al PM del NHS-N3 el PM del NHS obtenemos el PM de los grupos entrantes: 228,17 g/mol - 115,09 g/mol = **113,08 g/mol**. Lo mismo con el NHS-CC: 291,3 g/mol - 115,09 g/mol = **176,21 g/mol**.

Estos son los PM de los grupos introducidos que emplearemos en la Ecuación X para calcular el grado de modificación, una vez hallemos los PM de nuestros polímeros modificados.

5.2.3. PREPARACIÓN DE MICROGELES BASADOS EN ELRs

A continuación, se detalla el proceso de preparación de los microgeles basados en los ELRs ya funcionalizados previamente.

5.2.3.1. PREPARACIÓN DE LOS MICROGELES MEDIANTE LA TÉCNICA DE EMULSION BATCH

La obtención de microgeles se llevó a cabo mediante la técnica de **emulsion batch**, un método ampliamente utilizado para la generación de micropartículas de hidrogel en el que una fase acuosa (fase dispersa) se distribuye en forma de gotas dentro de una fase continua inmisible (normalmente oleosa) bajo agitación. Este proceso, además de permitir la formación de microgeles de manera sencilla y escalable, sirve como reactor en el que pueden producirse reacciones de entrecruzamiento in situ.

En este caso, la fase dispersa estuvo compuesta por disoluciones acuosas de ELRs previamente **funcionalizados** con grupos químicos complementarios, como ya hemos explicado anteriormente: VKV-CC y HRGD6-N3. Se prepararon las disoluciones de cada polímero funcionalizado en agua ultrapura (H₂O MQ) a una concentración de 100 mg/mL en la cámara fría.

Cada disolución polimérica se cargó en una jeringa tipo *luer-lock* (Figura 2), sellada con rosca para evitar pérdidas, y ambas se acoplaron a un sistema de mezcla *luer-lock* que permitía su combinación controlada justo antes de la extrusión. Este sistema consiste en la utilización de dos jeringas independientes, cada una cargada con uno de los polímeros previamente modificados. En una de ellas se introdujeron aproximadamente 2,5 mL de HRGD-N3, y en la otra la misma cantidad de VKV-cc, evitando en ambos casos llenar por completo el volumen de la jeringa para facilitar la manipulación. Ambas jeringas se acoplaron a un mismo sistema de extrusión que permite empujar simultáneamente los dos émbolos, de modo que ambos polímeros son impulsados a la vez hacia una punta mezcladora común. Esta punta, de unos 10cm de longitud, presenta en su interior una estructura helicoidal que asegura la mezcla homogénea de los dos flujos a medida que avanzan por el conducto.

La **fase oleosa** estuvo compuesta por aceite mineral y el surfactante Abil 90 en proporción 97:3 (% p/p). Esta mezcla se mantuvo en agitación continua durante toda la noche (O/N) en un recipiente con imán. La fase oleosa de reacción se preparó en la proporción de 30 mL de aceite por cada 5 mL de disolución polimérica total (suma de las disoluciones con grupos ciclo y azida). La mezcla oleosa se colocó sobre una placa de agitación modelo *Heidolph MR Hei-Mix L*, con un imán de 30,17 mm, ajustando la agitación a 250 rpm dentro de la cámara fría.

El sistema de jeringas acopladas, tal y como se muestra en la Figura 2, se montó en un brazo metálico, situando la salida de la boquilla a 15 cm de altura sobre la boca del recipiente con la fase oleosa en agitación, asegurando su centrado.

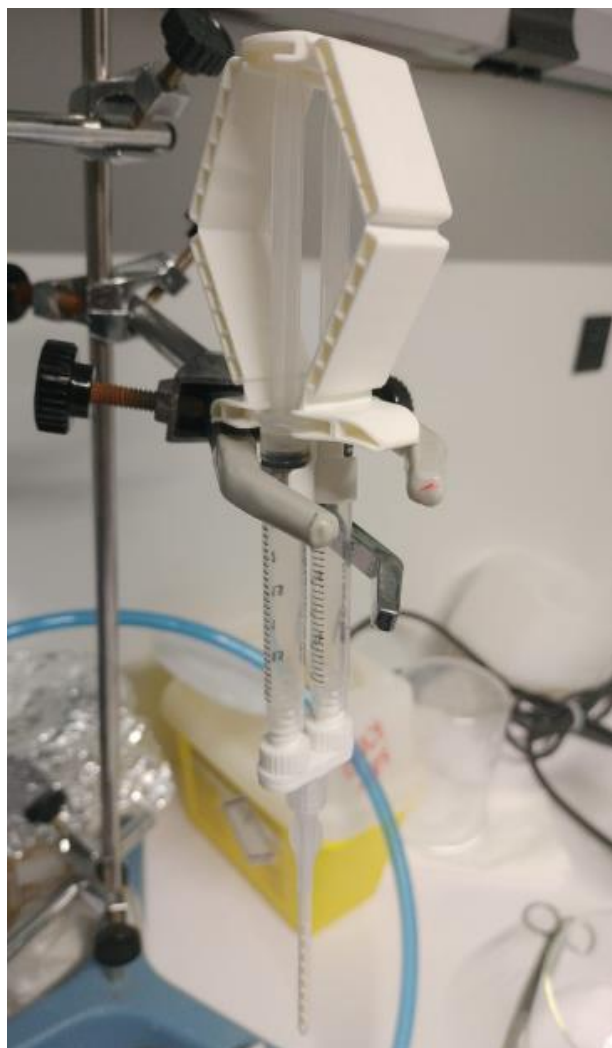


Figura 2: Sistema de jeringas acopladas

La extrusión de la mezcla se realizó de forma lenta y continua, gota a gota, permitiendo que las gotas acuosas se dispersaran en la fase oleosa y que, dentro de cada una, se produjera la **reacción click SPAAC** entre los dos ELRs funcionalizados. se llevó a cabo íntegramente en una cámara fría para mantener un ambiente controlado a baja temperatura y evitar la precipitación del polímero.

Tras vaciar por completo el contenido de ambas jeringas, la agitación se mantuvo durante 15 minutos adicionales para favorecer la homogeneidad y la gelificación de los microgeles. Finalmente, el recipiente se trasladó a una nevera, donde permaneció toda la noche (O/N) para completar el entrecruzamiento de las partículas antes de proceder a su recuperación y purificación.

5.2.3.2. PURIFICACIÓN DE LOS MICROGELES

A continuación, se llevó a cabo el protocolo de lavado y purificación de los microgeles mediante la centrifugadora de la Figura 3.



Figura 3: Centrífuga con la que se realizaron el lavado y jamming de los microgeles

Todo el volumen de aceite con los microgeles fue transferido cuidadosamente, utilizando espátulas de plástico, a un tubo Falcon de 50 mL con tapa verde apto para centrifugación. Se centrifugó a 500 Gs durante 5 minutos a 4 °C y, posteriormente, se decantó el aceite sobrenadante sobre un nuevo tubo Falcon (SUP1) para su conservación en caso de pérdidas accidentales.

Sobre el pellet obtenido se añadieron 15 mL de dietil-éter y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Tras la agitación, se volvió a centrifugar a 500 Gs durante 5 minutos a 4 °C, decantando el sobrenadante (SUP2) en un nuevo tubo.

Este procedimiento de lavado con éter se repitió tres veces más, obteniendo los sobrenadantes SUP3, SUP4 y SUP5, garantizando la completa eliminación del aceite residual.

Posteriormente, el pellet fue tratado con 15 mL de etanol al 70% (v/v), agitándose nuevamente durante 10 minutos a temperatura ambiente en el agitador orbital. Se centrifugó a 3500 Gs durante 10 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante (SUP6). Este paso de lavado con etanol 70% se repitió tres veces adicionales, obteniendo los sobrenadantes SUP7, SUP8 y SUP9.

A partir de este punto, se procedió con extrema precaución en cada decantación para evitar la pérdida de microgeles. El pellet fue resuspendido en 10 mL de medio acuoso y agitado durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 8000 Gs durante 10 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante (SUP10).

El lavado con agua ultrapura fue repetido dos veces más, generando los sobrenadantes SUP11 y SUP12.

Finalmente, los microgeles fueron almacenados en etanol 70% en caso de necesitar conservación prolongada.

5.2.3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MICROGELES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

La microscopía óptica de campo claro es una técnica de imagen con la que vamos a caracterizar los microgeles morfológicamente.

Para ello, se utilizó un sistema de adquisición Nikon Eclipse equipado con una cámara digital de alta resolución y controlado mediante el software especializado NIS-Elements. Esta técnica permite una visualización clara de la estructura, forma y distribución de tamaño de los hidrogel.

Las muestras fueron preparadas inmediatamente después de su formación y depositadas cuidadosamente sobre portaobjetos de vidrio.

Se empleó un objetivo de 10x. Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas utilizando el módulo de medición del software NIS-Elements Advanced Research, el cual permite realizar mediciones de diámetro, área y perímetro de las estructuras observadas con alta precisión.

Para cada condición experimental se analizaron al menos 20 gotas de microgeles, distribuidas en múltiples campos de visión para garantizar una muestra representativa. Las mediciones fueron realizadas manualmente. Los datos recogidos fueron exportados y tratados estadísticamente, calculando el diámetro medio y la desviación estándar correspondiente, con el fin de evaluar la uniformidad del proceso de formación del hidrogel.

5.2.4. ESTUDIO DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS

A continuación, se procederá a explicar el estudio de printabilidad realizado de los microgeles en su estado compactado, dividiendo el proceso en 4 pasos.

5.2.4.1. PREPARACIÓN DE LA TINTA: ESTUDIO DEL JAMMING

Para determinar las condiciones óptimas de compactación de los microgeles y obtener una formulación adecuada como tinta de impresión, se llevó a cabo un estudio sistemático del jamming. Este fenómeno describe el punto en el que una suspensión de partículas, en este caso microgeles, alcanza una densidad tal que adquiere un comportamiento sólido cohesivo, manteniendo la forma tras la extrusión.

El procedimiento consistió en someter suspensiones de microgeles a centrifugación a diferentes fuerzas relativas ($\times g$) y tiempos, con el fin de evaluar el grado de compactación alcanzado bajo cada condición. Las pruebas se realizaron en una centrífuga refrigerada, manteniendo la temperatura constante para evitar alteraciones en las propiedades de los hidrogeles.

Se ensayaron distintos medios líquidos como fase continua para la suspensión inicial de los microgeles, siguiendo el orden:

1. Agua ultrapura
2. Solución tampón PBS
3. Medio de cultivo celular

En cada ensayo, los microgeles previamente purificados se resuspendieron en el medio correspondiente, y se transfirieron a tubos de centrifugación. Posteriormente, se aplicaron diferentes velocidades de centrifugación (expresadas en G), evaluando la influencia de cada condición en la compactación y cohesión del pellet resultante.

El objetivo de esta fase fue identificar las condiciones de centrifugación y el medio de suspensión que proporcionaran un estado de jamming estable y reproducible, garantizando así la integridad de la tinta durante su manipulación e impresión en 3D.

Los microgeles, todos ellos a una temperatura de 4 °C, e inicialmente resuspendidos en agua, se sometieron a múltiples centrifugaciones desde 8000 G hasta 18.516 G, correspondiente a la máxima capacidad de la centrífuga disponible, durante intervalos prolongados de hasta 30 y 40 minutos.

En PBS, se aplicaron centrifugaciones de 10 minutos a 7.000 y 8.000 G.

En medio de cultivo, se implementó un protocolo secuencial de centrifugación progresiva: 2.000 G (10 min), 2.500 G (10 min), 3.000 G (10 min) y 3.500 G (10 min), lo que permitió incrementar progresivamente el grado de compactación.

El grado de jamming se evaluó de manera cualitativa mediante observación visual de la agregación de los microgeles y por inspección manual con espátula.

5.2.4.2. PRUEBA DE INYECTABILIDAD DE LA TINTA

Para evaluar la capacidad de la tinta formulada a partir de microgeles compactados para ser procesada mediante extrusión, se llevó a cabo un ensayo preliminar de inyectabilidad con manipulación manual. Este ensayo tuvo como objetivo comprobar la cohesión, continuidad del material antes de su carga en la impresora 3D, permitiendo descartar problemas de fluidez o deformación no deseada en etapas posteriores.

En la primera parte del procedimiento, se tomaron pequeñas porciones de microgeles compactados utilizando pinzas o una espátula, manipulándolas directamente para evaluar su respuesta frente a la aplicación de fuerza puntual. Este paso permitió observar cómo el material se deformaba bajo presión, si recuperaba parcialmente su forma y si mantenía su integridad estructural o tendía a fragmentarse. La manipulación con pinzas facilitó una apreciación inicial de la cohesión interna de los microgeles y de su resistencia mecánica frente a esfuerzos de compresión y tracción.

A continuación, se procedió a cargar manualmente los microgeles en una jeringa estéril equipada con boquilla de diámetro conocido. El llenado se realizó con cuidado para no introducir burbujas de aire que pudieran alterar el flujo. Una vez cargada, la jeringa se accionó manualmente ejerciendo presión constante sobre el émbolo, con el fin de extruir el material a un ritmo controlado.

Durante la extrusión manual se registraron cualitativamente aspectos como:

- **Continuidad del flujo:** si el material se expulsaba de forma continua o presentaba interrupciones.
- **Homogeneidad del filamento extruido:** regularidad del diámetro y ausencia de aglomeraciones o zonas sin compactar.
- **Capacidad de mantener la forma:** observación de si el filamento extruido colapsaba, se expandía o mantenía su geometría inicial tras el depósito.
- **Resistencia a la extrusión:** percepción de la fuerza necesaria para desplazar el material a través de la boquilla.

Este ensayo manual permitió simular, de manera cualitativa, las condiciones de extrusión que posteriormente se aplicarían en la bioimpresora, identificando de antemano posibles ajustes en la compactación del material, en la elección del diámetro de boquilla o en la velocidad de extrusión. La información obtenida en esta fase sirvió como referencia para planificar las pruebas automatizadas de impresión con los microgeles compactados.

La inyectabilidad de los microgeles compactados se evaluó mediante extrusión manual con jeringas de 3 mL acopladas a agujas de distinto calibre (21 G, 22 G y 20 G, tanto metálicas como cónicas). Se ensayaron microgeles resuspendidos en PBS y en medio de cultivo. El criterio de evaluación fue la capacidad del material para fluir de manera continua y formar un filamento uniforme al accionar el émbolo manualmente.

5.2.4.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE IMPRESIÓN CON MATERIAL MODELO

Con el fin de establecer una ventana de printabilidad aplicable en posteriores ensayos con los microgeles, se desarrolló una fase preliminar de optimización empleando crema Nivea como material modelo. Esta etapa permitió simular el proceso de extrusión y deposición de los microgeles en condiciones controladas, minimizando el consumo de material experimental y evitando pérdidas innecesarias de polímeros de interés biomédico.

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando una impresora 3D Regemat equipada con un sistema de extrusión mecánica por rosca, capaz de depositar materiales de alta viscosidad de manera precisa y reproducible. El modelo utilizado dispone de tres cabezales independientes, lo que permite acoplar simultáneamente hasta tres jeringas y realizar impresiones combinando diferentes biotintas o materiales de soporte.

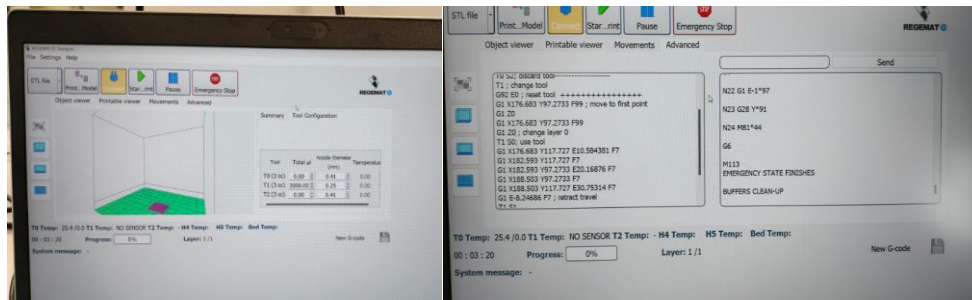


Figura 4: Interfaces del software de impresión de la impresora 3D Regemat

La elección de la crema Nivea respondió a sus propiedades viscoelásticas, que, aunque no idénticas a las de los microgeles de ELRs, permiten reproducir parcialmente las condiciones de extrusión de materiales blandos, facilitando así la calibración inicial del equipo.

Los modelos tridimensionales se diseñaron en formato STL y se importaron al software de control de la impresora, tal y como se muestra en la Figura 4. En esta interfaz se configuraron los parámetros geométricos de la impresión, tales como dimensiones del diseño, número de capas, orientación en el plano de trabajo, patrón de relleno y densidad de relleno. Una vez establecidos los ajustes, el archivo se procesó mediante la función Printable Model, que recalculó trayectorias, parámetros de extrusión y transformó el diseño en un código interpretable por la impresora.

Se realizó un estudio sistemático de los parámetros más relevantes para el proceso de impresión, agrupados en tres categorías:

1. Parámetros de flujo de material

- *Flow speed* (velocidad de extrusión): control de la tasa de salida del material a través de la boquilla.
- *Infill speed* (velocidad de relleno): velocidad a la que se deposita el material en las áreas interiores de la estructura.

2. Parámetros de trayectoria de la aguja

- *Deposit speed*: velocidad de los movimientos activos durante la deposición.
- *Perimeter speed*: velocidad de desplazamiento en el trazado de contornos, ajustada para optimizar la definición de bordes.

3. Parámetros de geometría de impresión

- *Skirt distance*: distancia del perímetro inicial (*skirt*) que se imprime antes de comenzar el modelo principal, utilizada para estabilizar el flujo y limpiar la boquilla.
- *Layer height* (altura de capa): grosor de cada capa depositada, ajustado para equilibrar resolución y velocidad de impresión.

Se controló también la temperatura de cama (25–40 °C) para favorecer la adhesión de las primeras capas y minimizar defectos, así como la velocidad de desplazamiento en vacío (*travel speed*) para optimizar los tiempos de impresión sin provocar hilos o irregularidades.

Para cada parámetro, se ensayaron diferentes valores manteniendo constantes el resto de variables, lo que permitió aislar su efecto sobre la deposición y la estabilidad estructural del material modelo. Este enfoque sistemático permitió generar una base de condiciones de impresión reproducibles y técnicamente válidas, que servirían como referencia inicial en la impresión de microgeles basados en ELRs.

Antes de iniciar cada impresión se seguía un protocolo establecido, que también sirvió para imprimir los microgeles:

1. Encendido y conexión de la impresora
2. Calibración del cabezal (proceso que, con el nuevo software, presentaba parámetros adicionales que complicaban la alineación de la aguja)
3. Selección del modelo de impresión y configuración de parámetros en el apartado *scaffolding*, *filling* y *tool configuration* (incluyendo volumen en microlitros, temperatura de trabajo, diámetro de aguja, entre otros).
4. Generación del archivo definitivo (*printable model*)
5. Verificación visual en la pestaña *printable viewer*
6. Colocación de la aguja en su punto de inicio (*homing*),

Cabe destacar que en todo momento se contaba con un botón de parada de emergencia para evitar daños en caso de colisión del cabezal o fallos mecánicos.

5.2.4.4. ESTUDIO DE LA VENTANA DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS

Una vez obtenido el material en estado de *jamming* óptimo, (en medio de cultivo y a 3500G y 10 minutos de centrifugación), los microgeles compactados se cargaron cuidadosamente en jeringas. Este paso tuvo como objetivo evaluar directamente el comportamiento de la tinta bajo condiciones de impresión controladas y establecer la denominada **ventana de printabilidad**, entendida como el rango de parámetros que permite una extrusión continua, uniforme y reproducible del material, manteniendo la forma de la estructura impresa.

Las jeringas cargadas se acoplaron al sistema de extrusión mecánica de la impresora tal y como se muestra en la Figura 5, configurando el equipo con los parámetros de impresión identificados previamente durante las pruebas con crema Nivea (flujo, velocidad de relleno, altura de capa, temperatura de cama, etc.). Partiendo de dichos valores de referencia (1.3 mm/s de infill speed y 0.1 mm/s de flow speed), se realizaron ajustes sistemáticos en estos dos parámetros, estudiando valores de flow speed desde 0.1 a 13.0 mm/s, así como de infill speed, desde 0.5 hasta 2.0 mm/s, modificando su magnitud de forma aislada para evaluar su efecto sobre el proceso de extrusión y la morfología del material depositado.

En cada ensayo se registró de manera cualitativa el comportamiento del material durante la extrusión, incluyendo aspectos como la continuidad y estabilidad del flujo, la capacidad de mantener la geometría tras el depósito, la respuesta del material a cambios en la velocidad de extrusión y desplazamiento, así como posibles fallos de impresión, como obstrucciones, falta de extrusión o deformaciones de la estructura.

Este procedimiento permitió correlacionar las variaciones en los parámetros de impresión con las respuestas observadas en el comportamiento de los microgeles, definiendo así el rango óptimo de condiciones —la ventana de printabilidad— para futuras aplicaciones de bioimpresión con este material.



Figura 5: Imagen de la impresora 3D Regemat con la jeringa ya montada, que contiene los microgeles ya preparados para imprimir

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En todo este apartado se procederá al análisis de los resultados obtenidos mediante la aplicación de la metodología previamente descrita, así como a su discusión crítica con el objetivo de extraer conclusiones relevantes.

6.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS ELRs FUNCIONALIZADOS

6.1.1. RMN

Se presentan los espectros obtenidos de los polímeros modificados:

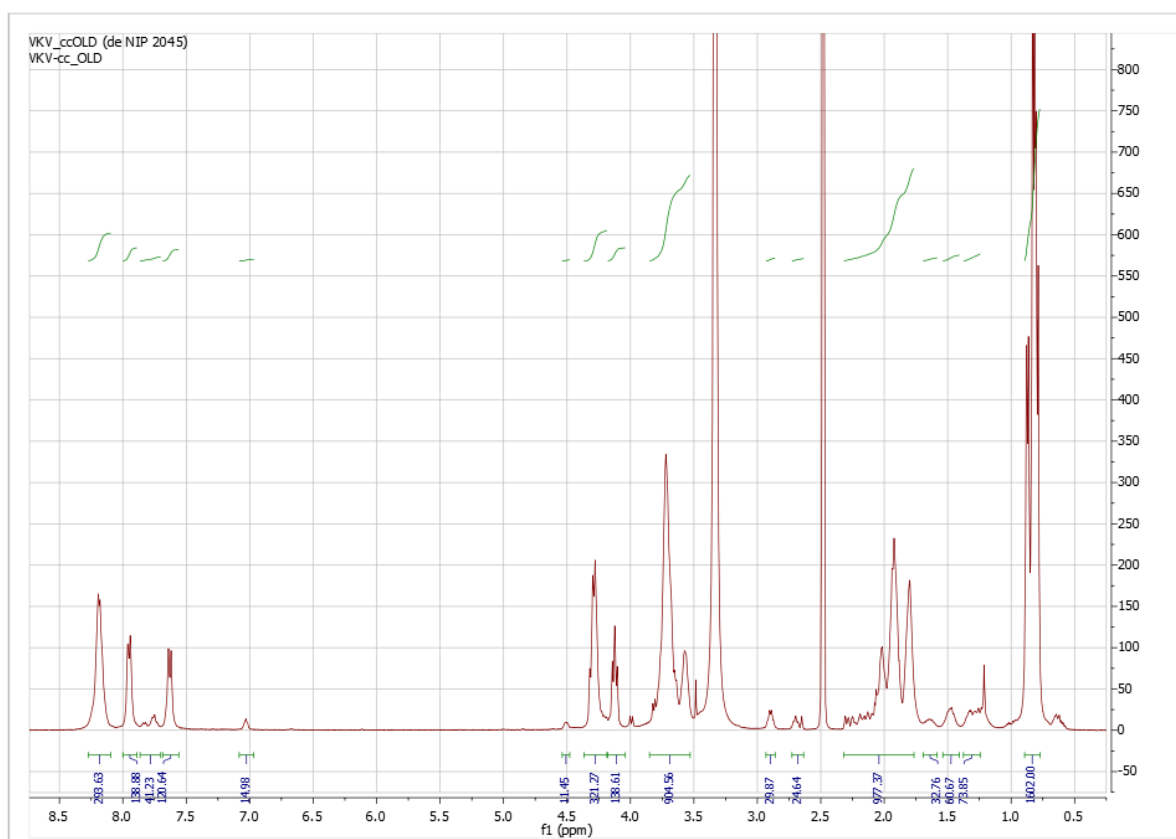


Figura 6: Espectro RMN del polímero VKV24 modificado

En el espectro del VKV-cc se observa la señal característica asociada a la introducción del grupo ciclooctino. Esta se encuentra en torno a 7,1 ppm, y posee un valor, como se puede apreciar en la Figura 6, de 14,98. Este valor nos indica que se han modificado 15 aminas.



Figura 7: Espectro RMN del polímero HRGD6 modificado

En el espectro del HRGD₆-N₃ se identifica el pico característico asociado a la introducción del grupo azida. Esta se encuentra en torno a 7,2 ppm, y posee un valor, como se puede observar en la Figura 7, de 14,84. Este valor nos indica que se han modificado 15 aminas.

Se presenta el análisis de los polímeros y VKV₂₄ HRGD₆ modificados, obteniéndose los siguientes resultados:

Reacción	Polímero modificado	Aminas a modificar	Aminas modificadas	Grado de modificación
1	VKV-cc	15	14,98	59,9%
2	HRGD-N3	15	14,84	59,4%

Tabla 6: Resultados obtenidos para las reacciones de los polímeros modificados

El grado de modificación alcanzado es prácticamente del 60%, por lo que podemos concluir que la modificación ha sido óptima y se han modificado las aminas que queríamos.

6.1.2. MALDI-TOF

Esta técnica nos permite observar la diferencia entre el peso molecular del polímero original y el del polímero modificado. Gracias a esta diferencia de pesos, es que podemos determinar el número de aminas modificadas. El número de aminas modificadas se determina según la ecuación.

Se tomaron 3 medidas del polímero sin modificar (Figura 8) y 3 del polímero modificado (Figura 9), y se calcularon las medias.

Polímero	Peso molecular (Da)
HRGD ₆ NM	61057
HRGD ₆ -N3	62863
VKV ₂₄ NM	60495
VKV-cc	63577

Tabla 7: Pesos moleculares polímeros sin modificar y polímeros modificados

A continuación, se muestra las imágenes de cada uno de ellos con su respectivo análisis:

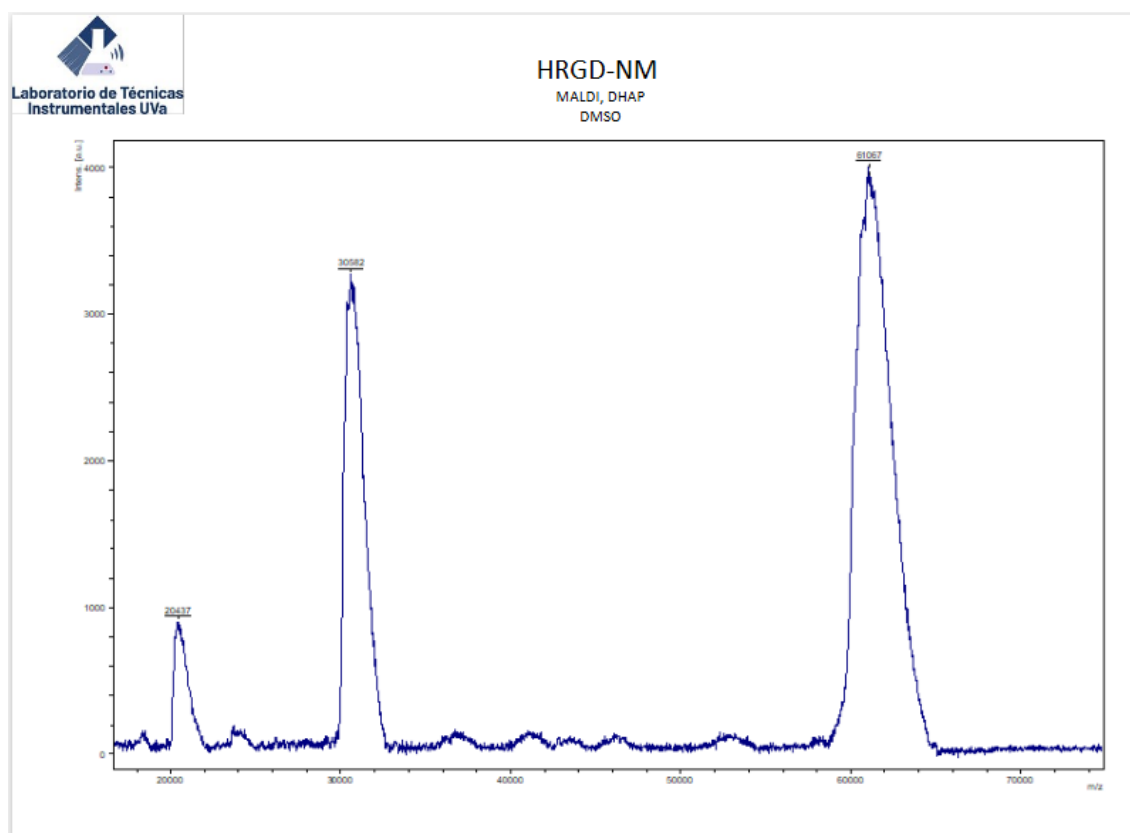


Figura 8: Maldi-TOF HRGD6 sin modificar

En la Figura 8 se puede observar un pico mayoritario promedio de 61067 Da correspondiente al peso molecular experimental del polímero. El error obtenido respecto a la masa teórica del polímero (60649.90 Da) es del 0.687%. Este error es inherente de la técnica cuando analiza moléculas de tales dimensiones, por lo que se considera como un valor adecuado. Podemos ver otro segundo pico de menor intensidad de 30582 Da, que, de lo más seguro, se deba a la segunda ionización del polímero, ya que presenta aproximadamente la mitad de intensidad que el pico mayoritario.

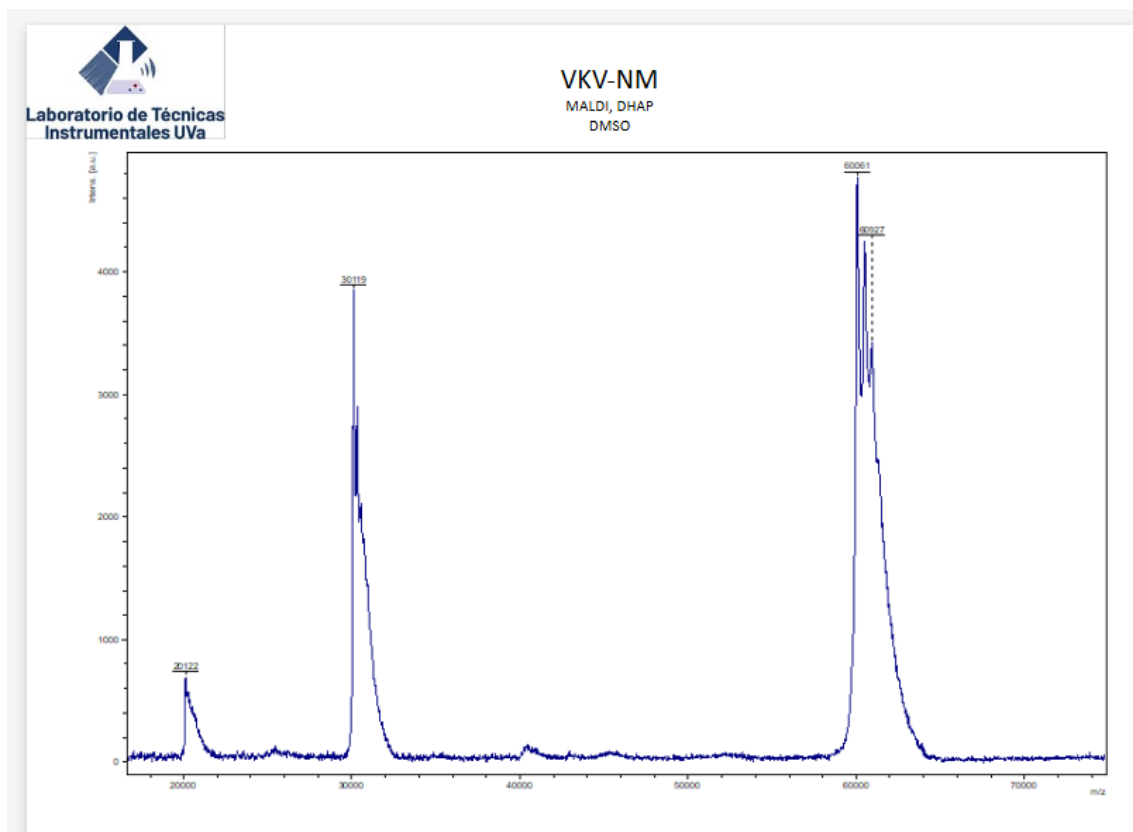


Figura 9: Maldi-TOF VKV24 sin modificar

En la Figura 9 se puede observar un pico mayoritario promedio de 60061 Da correspondiente al peso molecular experimental del polímero. El error obtenido respecto a la masa teórica del polímero (60450.91 Da) es del 0.645%. Este error es inherente de la técnica cuando analiza moléculas de tales dimensiones, por lo que se considera como un valor adecuado. Podemos ver otro segundo pico de menor intensidad de 30119 Da, que seguramente se deba a la segunda ionización del polímero, ya que presenta aproximadamente la mitad de intensidad que el pico mayoritario.

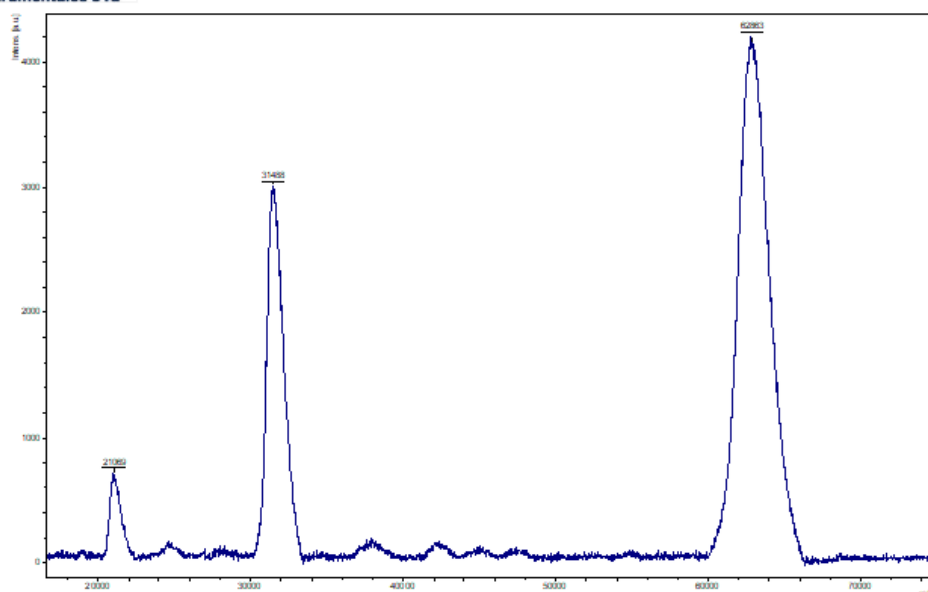


Figura 10: Maldi-TOF HRGD6 modificado con N3

En la Figura 10 se puede observar un pico mayoritario promedio de 62863 Da correspondiente al peso molecular experimental del HRGD₆ modificado. Podemos observar otro segundo pico de menor intensidad de 31488 Da, que, muy probablemente, se deba a la segunda ionización del polímero, ya que presenta aproximadamente la mitad de intensidad que el pico mayoritario.

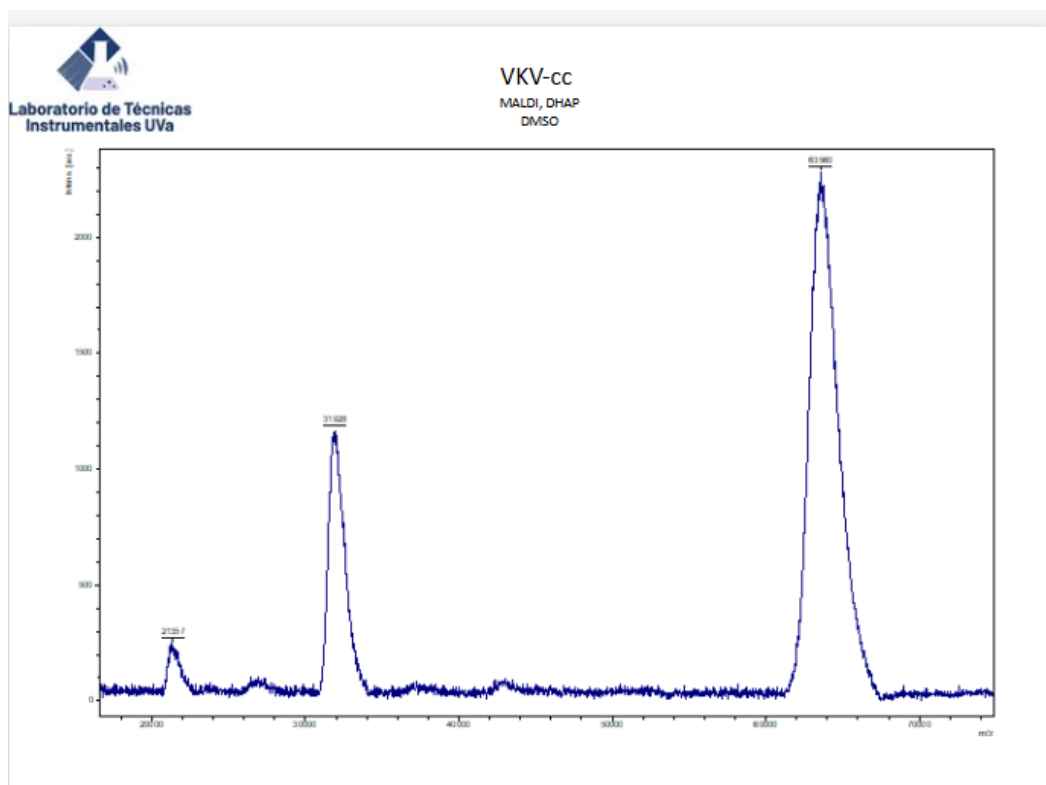


Figura 11: Maldi-TOF VKV₂₄ modificado con CC

En la Figura 11 se puede observar un pico mayoritario promedio de 63560 Da correspondiente al peso molecular experimental del VKV₂₄ modificado. Podemos ver otro segundo pico de menor intensidad de 31928 Da, que, seguramente, se deba a la segunda ionización del polímero, ya que presenta aproximadamente la mitad de intensidad que el pico mayoritario.

Los resultados obtenidos según la ecuación 2 son los siguientes:

REACCIÓN	REACT	PM	Aminas Mod	% Aminas Mod
HRGD ₆ -N3	NHS-N3	62863	15,84	63,4 %
VKV ₂₄ -CC	NHS-CC	63577	17,41	69,6 %

Tabla 8: Resultados obtenidos para las reacciones del HRGD₆ y del VKV₂₄

Los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF confirman de manera consistente la correcta modificación química de los polímeros HRGD₆ y VKV₂₄. En ambos casos se observó un desplazamiento del pico mayoritario hacia mayores masas respecto al polímero sin modificar, lo que es coherente con la incorporación de los grupos funcionales.

La diferencia de masas observada entre el polímero sin modificar y el modificado se corresponde con la adición de varios grupos reactivos a través de las aminas disponibles. Los cálculos realizados muestran una modificación media de aproximadamente 15,8 aminas en HRGD-N3 (63,4 %) y 17,4 aminas en VKV-cc (69,6 %). Estos valores se encuentran muy próximos al objetivo experimental planteado, que era obtener una modificación del 60 % de las 25 aminas disponibles (≈ 15 aminas modificadas).

Por tanto, los resultados son coherentes con las expectativas iniciales y demuestran que el procedimiento seguido permitió alcanzar el grado de modificación buscado. Este nivel de funcionalización es adecuado para garantizar la posterior reacción “CLICK” entre ambos polímeros durante la formación de los microgeles.

6.2. PREPARACIÓN DE MICROGELES BASADOS EN ELRs

6.2.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS MICROGELES

Los microgeles empleados en este estudio se obtuvieron mediante la técnica de emulsion batch, previamente descrita. Al mezclarse ambos polímeros funcionalizados dentro de la gota acuosa y en presencia de la agitación, tiene lugar la **reacción click** del tipo *Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition* (SPAAC), que provoca el entrecruzamiento covalente y estable de las cadenas poliméricas. Esta reacción ocurre de forma inmediata durante la emulsión, siendo el paso clave que conduce a la formación de microgeles estables con una arquitectura definida.

La eficacia de este procedimiento permitió la obtención de microgeles homogéneos y reproducibles en medio oleoso. Fueron sometidos a su caracterización morfológica mediante microscopía óptica, antes de proceder a su purificación y lavado.

En este apartado se incluyen las imágenes representativas obtenidas, y los histogramas con los valores medidos de diámetro de las esferas de los microgeles.

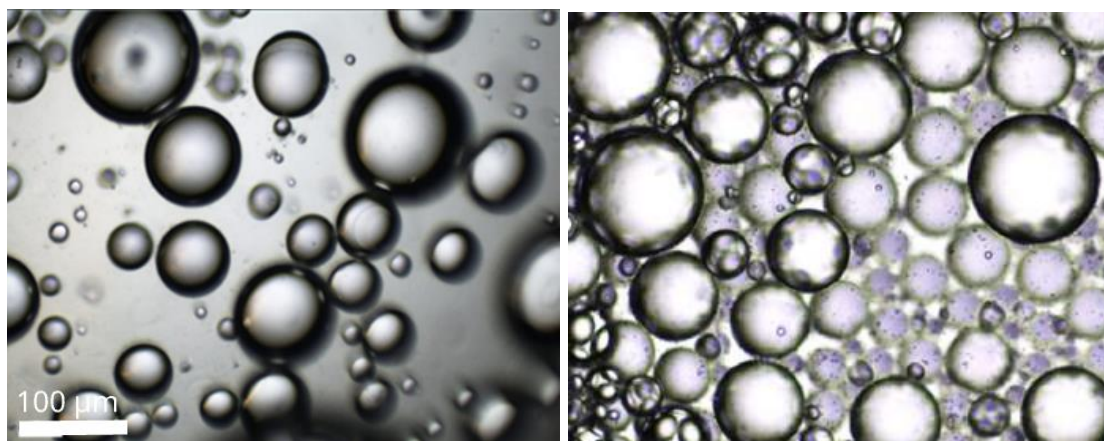


Figura 12: Imágenes de microscopía óptica a misma escala de los microgeles de una misma muestra en fase oleosa con el objetivo 10x. La imagen de la izquierda se corresponde a la tomada antes de la purificación, y la de la izquierda tras la misma.

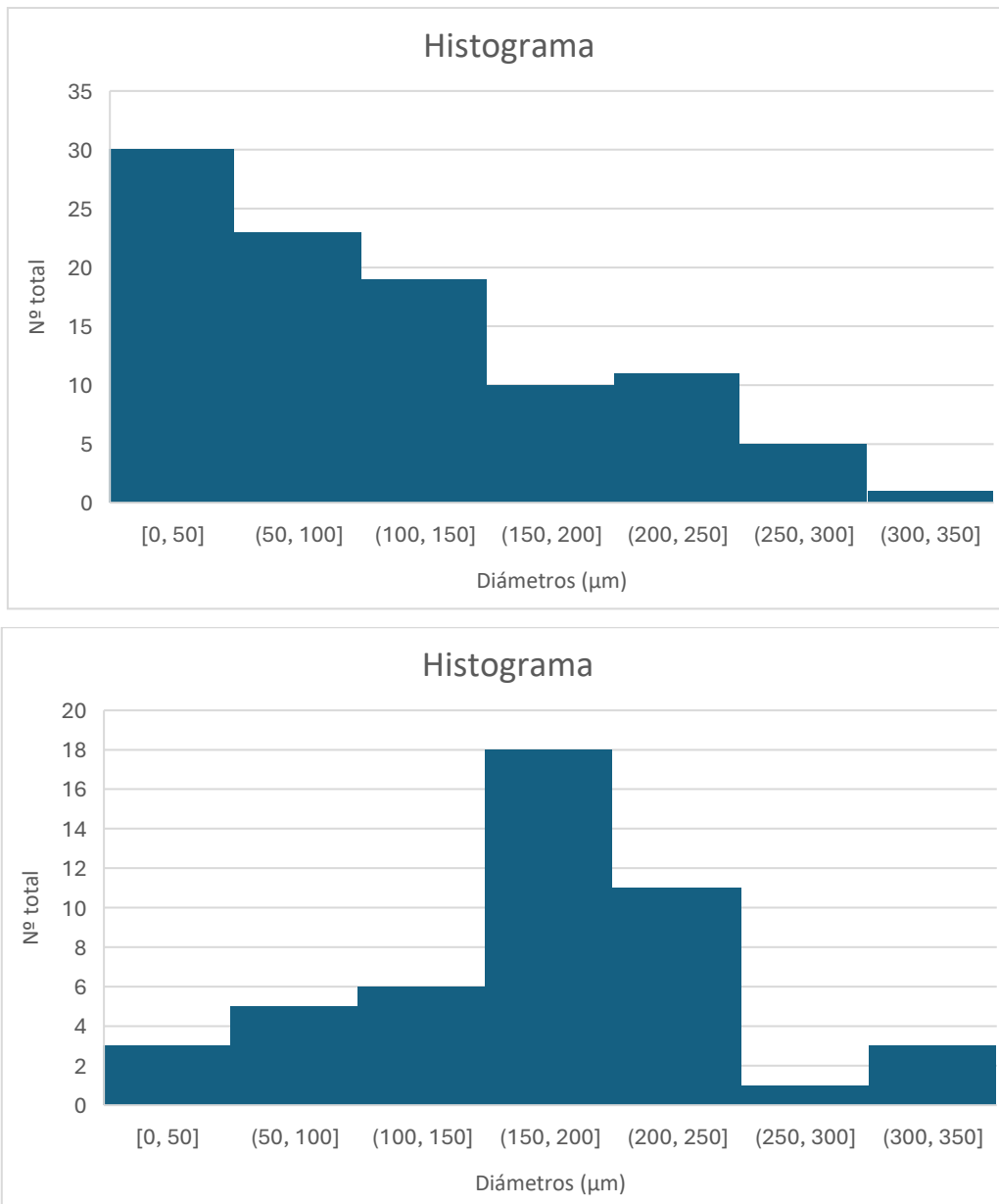


Figura 13: Histogramas de las medidas realizadas a los diámetros de las esferas de los microgeles: El de arriba se corresponde a antes de su purificación, y el de abajo tras la misma.

El histograma realizado a los microgeles **antes de su purificación** muestra que la mayoría de los microgeles presentan un diámetro comprendido en el rango de 0–50 μm , acumulando 30 observaciones. A partir de ahí, la frecuencia disminuye progresivamente conforme aumenta el tamaño: alrededor de 23 microgeles en el intervalo de 50–100 μm , unos 18 en los rangos de 100–150 μm , y una frecuencia mucho menor en los intervalos superiores a 150 μm .

Este resultado indica que la distribución de tamaños es ligeramente asimétrica, con un predominio de microgeles de pequeño diámetro y una fracción decreciente de partículas de mayor tamaño. Se observa, por tanto, una distribución heterogénea polidispersa, aunque centrada mayoritariamente en diámetros por debajo de 100 μm .

Por otro lado, el histograma realizado a los microgeles **tras su purificación** muestra que muchos de los microgeles de diámetro <150 μm han sido eliminados (solamente 14 medidas realizadas de este rango de diámetro), mientras que los

microgeles de tamaño superior a este diámetro permanecieron inalterados en cuanto a su frecuencia.

En conclusión, la purificación permitió eliminar de forma eficaz la fracción de microgeles de menor tamaño, homogeneizando la distribución hacia diámetros más grandes y eliminando las partículas indeseadas de pequeño tamaño, lo cual constituye un paso clave para obtener una población de microgeles más uniforme y adecuada para posteriores aplicaciones en bioimpresión.

6.3. ESTUDIO DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS

6.3.1. PREPARACIÓN DE LA TINTA. ESTUDIO DEL JAMMING

El proceso de jamming fue el siguiente:

- En **agua ultrapura**, incluso aplicando altas fuerzas centrífugas (hasta 18 516 G) y tiempos prolongados (30 min), no se observaron cambios morfológicos relevantes ni un nivel adecuado de compactación, manteniéndose los microgeles dispersos (Figura 14).



Figura 14: Microgeles sin compactar en medio acuoso tras realizar el jamming a 18.516 G.

- En **PBS**, una sola centrifugación a 8000 G durante 10 minutos a 4 °C permitió obtener una compactación visualmente evidente, con formación de agregados cohesivos, aunque el exceso de compactación dio lugar a pellets excesivamente rígidos.
- En **medio de cultivo**, con centrifugaciones desde 2000 a 3500G, se alcanzó un comportamiento similar al observado en PBS, pero con pellets mucho menos rígidos y aglomeración clara entre microgeles.

La aplicación de centrifugaciones secuenciales de los microgeles en medio de cultivo con incremento progresivo de fuerza (2000–3500 G) permitió obtener un estado intermedio entre la no compactación en medio acuoso y la excesiva rigidez en PBS: pellets densos pero aún deformables, que mostraron una textura más plástica y manejable, considerada como condición óptima para su posterior manipulación (Figuras 15 y 16).

En conjunto, el proceso de jamming mostró una clara dependencia tanto del medio de suspensión como de las condiciones de centrifugación. Por otro lado, los resultados ponen de manifiesto que el medio de suspensión es un factor determinante para favorecer la cohesión inicial de los microgeles, siendo PBS y el medio de cultivo notablemente más efectivos que el agua, especialmente el segundo, debido a que los pellets logrados estaban compactos pero no rígidos, y se podían deformar con facilidad. Asimismo, la modulación progresiva de la fuerza centrifuga resulta clave para ajustar el grado de compactación, identificándose 3500 G como un valor óptimo para alcanzar un pellet compacto pero con la plasticidad necesaria para la extrusión en bioimpresión.



Figura 15: Aspecto de los microgeles en medio de cultivo tras el jamming realizado a 2500 G.



Figura 16: Aspecto de los microgeles tras haber realizado el jamming a 3000 G y recogerlos con una espátula.

6.3.2. PRUEBA DE INYECTABILIDAD DE LA TINTA

La inyectabilidad de los microgeles mostró una fuerte dependencia tanto del medio de suspensión como del calibre y la geometría de la aguja empleada.

- **En PBS**, los microgeles se encontraban excesivamente compactados, lo que generó bloqueos en la aguja metálica de 21 Gauge e impidió su extrusión.
- **En medio de cultivo**, con los microgeles centrifugados a 3500 G, se obtuvo una ligera mejora en la fluidez, sobre todo al emplear agujas cónicas (22 Gauge), que reducían la resistencia al paso. Sin embargo, la alta compactación de los agregados seguía limitando el flujo continuo y se observaban obstrucciones recurrentes.

La mejor respuesta se obtuvo al emplear microgeles resuspendidos en medio de cultivo a 3500 G y extruidos mediante una aguja cónica de 20 G, como se muestra en la Figura 17. En estas condiciones, el flujo fue continuo, sin interrupciones apreciables, lo que permitió mantener una extrusión estable a lo largo de todo el proceso. El filamento extruido presentó una buena homogeneidad, con un diámetro relativamente constante y sin evidencias de aglomerados o zonas mal compactadas. En cuanto a la capacidad de mantener la forma, el material depositado conservó de manera satisfactoria la geometría impuesta por la trayectoria de la jeringa, evitando tanto el colapso como una expansión excesiva tras su deposición. Finalmente, la resistencia a la extrusión fue adecuada: se percibió una fuerza de desplazamiento moderada, suficiente para garantizar la cohesión del material, pero sin llegar a comprometer la continuidad del flujo.

En conjunto, estos resultados confirman que la inyectabilidad está fuertemente condicionada por el **grado de compactación** del material, así como por el calibre y diámetro de la aguja utilizada. Un exceso de compactación dificulta la extrusión y reduce la homogeneidad, mientras que la presencia controlada de medio de cultivo facilita un

flujo uniforme y reproducible. El uso de agujas cónicas de mayor calibre (**20 G**) se identificó, por tanto, como la opción más adecuada para alcanzar simultáneamente continuidad de flujo, regularidad del filamento, estabilidad de la forma y resistencia óptima a la extrusión, requisitos indispensables para su aplicación en bioimpresión 3D.

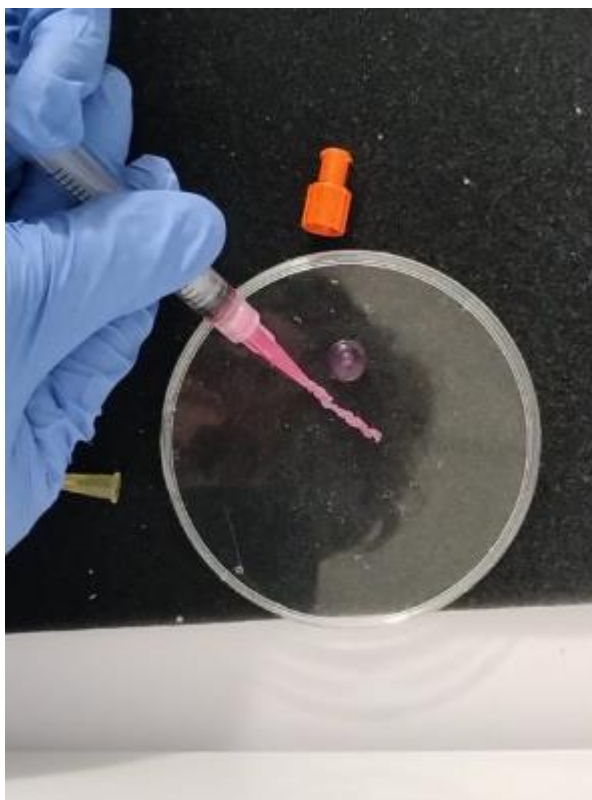


Figura 17: Realización de la prueba manual a 3500 G y aguja de 20 Gauge, comprobando la inyectabilidad de los microgeles sobre una placa Petri.

6.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE IMPRESIÓN CON MATERIAL MODELO

Durante todo este proceso, se evaluaron múltiples parámetros críticos para la impresión, distinguiéndose los tres bloques principales explicados en Metodología: los relacionados con el flujo del material, los vinculados a la trayectoria de la aguja y los relacionados con la geometría de impresión.

Tras numerosos ensayos, como los que se muestran en las Figuras 18 y 19, los resultados finales del proceso de optimización con Nivea son los siguientes:

- **Flow speed (velocidad de extrusión del material):** Es el parámetro más crítico junto con la infill speed. En los ensayos realizados se logró optimizar este valor en **0,1 mm/s** para agujas cónicas de **0,25 mm de diámetro** (31 Gauge), obteniéndose filamentos continuos, sin discontinuidades ni sobreextrusión. Para agujas de **0,72 mm** (22 Gauge), el valor óptimo fue **0,4 mm/s**.
- **Infill speed (velocidad de relleno):** En combinación con la flow speed, su ajuste es crucial para lograr una deposición homogénea. Se optimizó a **1,3 mm/s** para agujas de 0,25 mm y a **1,0 mm/s** para agujas de mayor diámetro (0,72 mm).

- **Deposit speed:** Se probaron diferentes configuraciones para evaluar su influencia en la precisión de los bordes y en la uniformidad del relleno. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los diseños en ninguna de las modificaciones de sus parámetros.
- **Perimeter speed:** Se emplearon diferentes valores entre **5 y 20 mm/s** al principio del proceso de optimización, pero dejó de ser útil ya que no se siguió utilizando perímetro en los diseños a mitad del proceso.
- **Skirt distance:** Este parámetro, ajustable automáticamente por el software en función del modelo, determina el perímetro de material preliminar antes de iniciar la impresión del diseño principal. Su función es estabilizar el flujo y limpiar la boquilla. Se identificó que la reducción de este parámetro puede ayudar a conservar material sin comprometer la estabilidad inicial de la impresión.
- **Retract speed:** Se evaluaron diferentes valores de esta velocidad, ya que según informó el responsable de Regemat este parámetro controla la retracción de la Nivea en los movimientos de desplazamiento de la jeringa en los que no echa material. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de sus valores, y eso provocó que fuese difícil impedir que algo del material no saliese expulsado en los desplazamientos que realizaba la jeringa debido a la inercia de extrusión de la misma.
- **Layer height (altura de capa):** Se trabajó con valores de entre **0,1 y 0,3 mm**, siendo **0,2 mm** el valor que ofreció mejor equilibrio entre resolución y tiempo de impresión. Una capa demasiado fina favorece la definición, pero puede dificultar la extrusión si el material es demasiado denso.
- **Bed temperatura (temperatura de cama):** Aunque la crema Nivea se imprime a temperatura ambiente, se evaluaron temperaturas de 25 a 40 °C. Se observó que una temperatura ligeramente elevada (~30–35 °C) favorece la adhesión de las primeras capas y reduce la formación de burbujas o irregularidades superficiales.
- **Travel speed (velocidad de desplazamiento en vacío):** Ajustada para reducir los tiempos muertos sin provocar hilos o defectos. Se estableció un valor de **99 mm/s** (el más rápido posible) como el más eficiente en las condiciones ensayadas.



Figura 18: Diseño de una sola capa impreso con crema Nivea con una flow speed de 1.0 mm/s, una infill speed de 1,5 mm/s, una layer height de 0,3 mm, una bed temperatura de 25°C, una travel speed de 99 mm/s y un diámetro de la aguja de 0,25 mm/s.

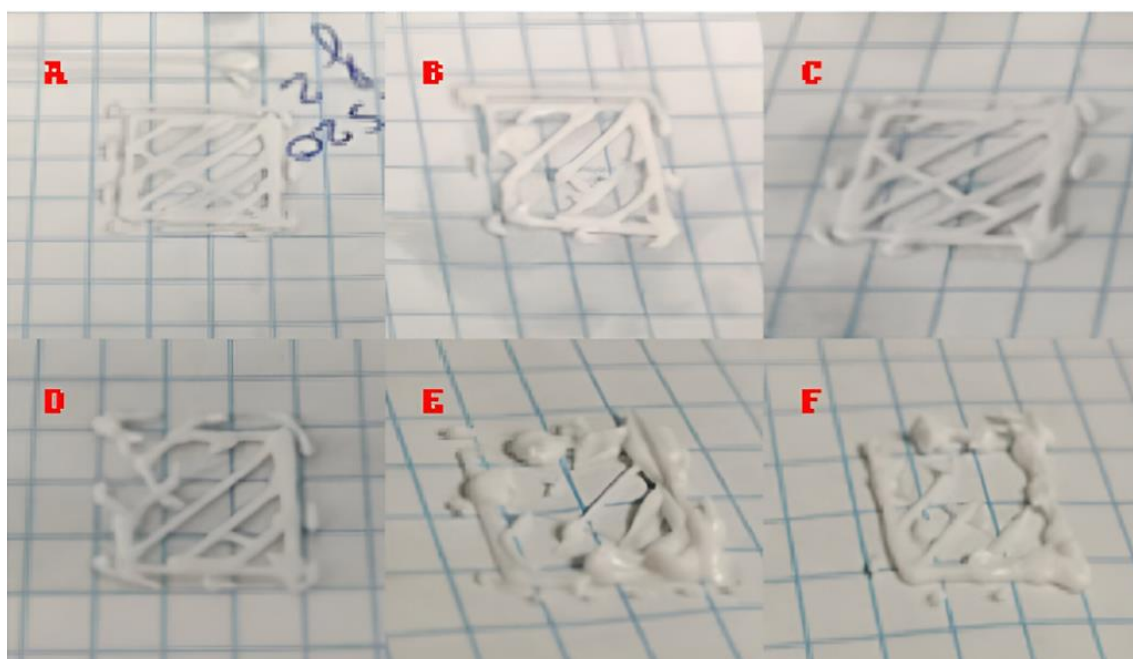


Figura 19: Varios diseños de una sola capa impresos sobre papel con crema Nivea con unos parámetros fijos de infill speed de 1,2mm/s, layer height de 0,2 mm, bed temperatura de 25°C, travel speed de 99 mm/s y diámetro de la aguja de 0,25 mm/s. En este caso, se fue variando la flow speed: A) 0,2 mm/s, B) 0,4 mm/s, C) 0,6 mm/s, D) 0,5 mm/s, E) 0,8 mm/s, F) 0,7 mm/s.

Uno de los objetivos esenciales de esta fase fue alcanzar reproducibilidad en las impresiones, es decir, que a partir de una misma combinación de parámetros, los resultados obtenidos fueran constantes en distintas repeticiones. Para ello, se realizaron múltiples réplicas de estructuras idénticas, observándose que, una vez optimizados los valores de flow speed e infill speed para cada tipo de aguja, la geometría resultante era altamente reproducible, sin variaciones significativas en dimensiones, continuidad de los filamentos o defectos estructurales, tal y como se muestra en la Figura 20, donde se alcanzó un diseño de hasta 20 capas exactamente iguales una encima de la otra.

Si bien la crema Nivea y los microgeles tienen composiciones y propiedades físicas muy diferentes (densidad, viscosidad, elasticidad, capacidad de gelificación), la definición de esta ventana de printabilidad permite anticipar el comportamiento general del sistema de impresión y acotar el rango de ensayo cuando se trabaje con biotintas reales. Esta estrategia permite reducir significativamente el número de pruebas, ahorrar material y optimizar el tiempo experimental, facilitando la puesta en marcha de protocolos específicos para cada hidrogel.

En resumen, la etapa de pruebas con crema Nivea ha permitido definir un marco de parámetros robusto, ajustable y validado, que será clave en la siguiente fase del TFG centrada en la impresión de microgeles con potencial aplicación en medicina regenerativa.



Figura 20: Diseño de 20 capas imprimido con crema Nivea sobre un pocillo tras la optimización final de parámetros, que son: flow speed de 0,1mm/s, una infill speed de 1,3 mm/s, una layer height de 0,15 mm, una bed temperatura de 25°C, una travel speed de 99 mm/s y un diámetro de la aguja de 0,25 mm/s.

6.3.4. ESTUDIO DE LA VENTANA DE PRINTABILIDAD DE LOS MICROGELES COMPACTADOS

La evaluación de la ventana de printabilidad de los microgeles se refleja en las siguientes tablas. Nótese en las siguientes Tablas que todos los parámetros son fijos excepto el de “Infill speed” y “Flow speed”, que vienen reflejados en la Tabla 12 con los resultados asociados.

Infill pattern	Altura del scaffold (mm)	Anchura del scaffold (mm)	Longitud del scaffold (mm)	Tamaño del poro (mm ²)	Altura de la capa (mm)	Ángulo del poro (°)	Capas totales
Diagonal	0.41	22.00	21.00	5.50	0.25	90	1

Tabla 9: Parámetros de Scaffold empleados en la impresora 3D

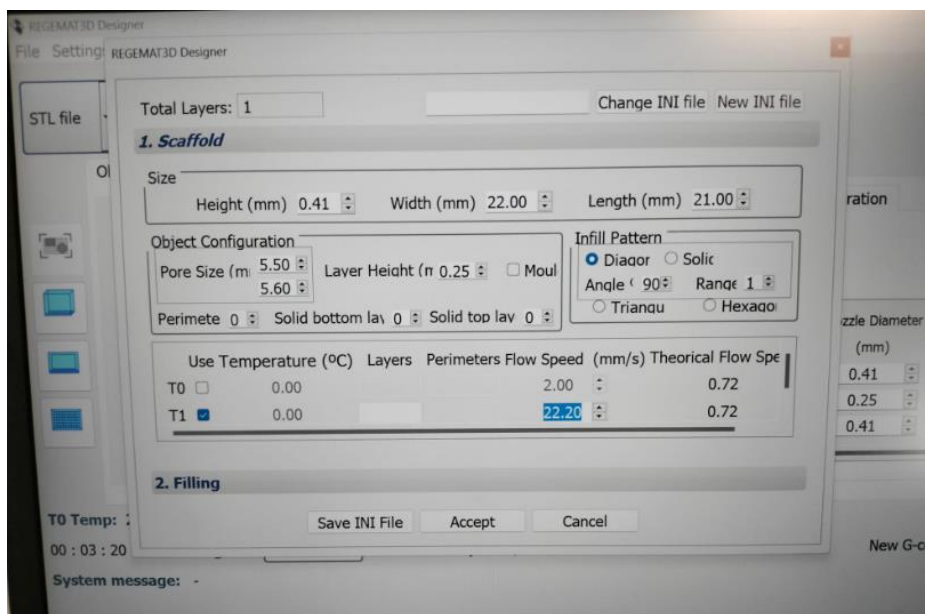


Figura 21: Ajuste de los parámetros de impresión en la ventana Scaffold de la impresora 3D Regemat

Deposit speed (mm/s)	Compensate	Retract	Retract speed (mm/s)	Purge
7.00	0.00	0.00	1.00	0.00

Tabla 10: Parámetros de Filling empleados en la impresora 3D

Perimeter / Skirt	Retract speed (mm/s)	Perimeter speed (mm/s)	Travel speed (mm/s)
No	7.00	20.00	99.99

Tabla 11: Parámetros de Extra Configuration empleados en la impresora 3D

Flow speed (mm/s)	Infill speed (mm/s)	Resultados
0.1	1.5	No imprime
0.5	1.5	No imprime
1.0	1.5	No imprime
2.0	1.5	No imprime
3.0	1.5	No imprime
4.0	1.5	No imprime
5.0	1.5	No imprime
5.5	1.5	No imprime
6.0	1.5	No imprime
6.5	1.5	No imprime
7.0	1.5	No imprime

7.5	1.5	No imprime
8.0	1.5	Extruye algo de microgeles al final. (Figura 23, imagen A)
8.5	1.5	Extruye algo más de microgeles al final.
9.0	1.5	Extruye pequeños tramos que se entrecortan. (Figura 23, imagen B)
9.0	1.0	Extruye pequeños tramos que se entrecortan (Figura 25, imagen C)
9.5	1.0	Extruye dos tramos largos entrecortados entre sí. (Figura 23, imagen D)
9.5	2.0	Demasiado rápido, no da tiempo a los microgeles a asentarse y queda todo en un solo punto.
9.7	1.5	Extruye adecuadamente, es fiel al diseño creado, aunque se entrecorta ligeramente. (Figura 23, imagen E)
9.8	1.2	Extruye adecuadamente, es fiel al diseño y apenas se entrecorta.
10.0	1.2	Extruye adecuadamente, es fiel al diseño creado, y no se entrecorta. (Figura 23, imagen F)
10.0	0.8	Extruye adecuadamente, aunque al ir más lenta la aguja se acumulan más microgeles y la línea es más gruesa.
10.1	1.2	Extruye adecuadamente, es fiel al diseño y no se entrecorta, aunque el diseño es ligeramente más grueso.
10.2	1.3	La línea empieza a ser más gruesa.
10.3	1.4	La línea es más gruesa a pesar de ir más rápido la aguja.
10.4	1.5	Extruye muchos microgeles al principio, queda poco para el resto del diseño.
10.5	1.6	Extruye gran parte de los microgeles al principio. (Figura 23, imagen G)

11.0	1.7	Prácticamente extruye todos los microgeles de golpe.
11.5	2	A pesar de la aguja ir mucho más rápida, extruye demasiada cantidad y lo echa todo de golpe. (Figura 23, imagen H)
12.0	2.5	Lo echa todo al inicio, con mucha fuerza.

Tabla 12: Variación de los parámetros de flow speed e infill speed de la impresora 3D Regemat con sus resultados asociados

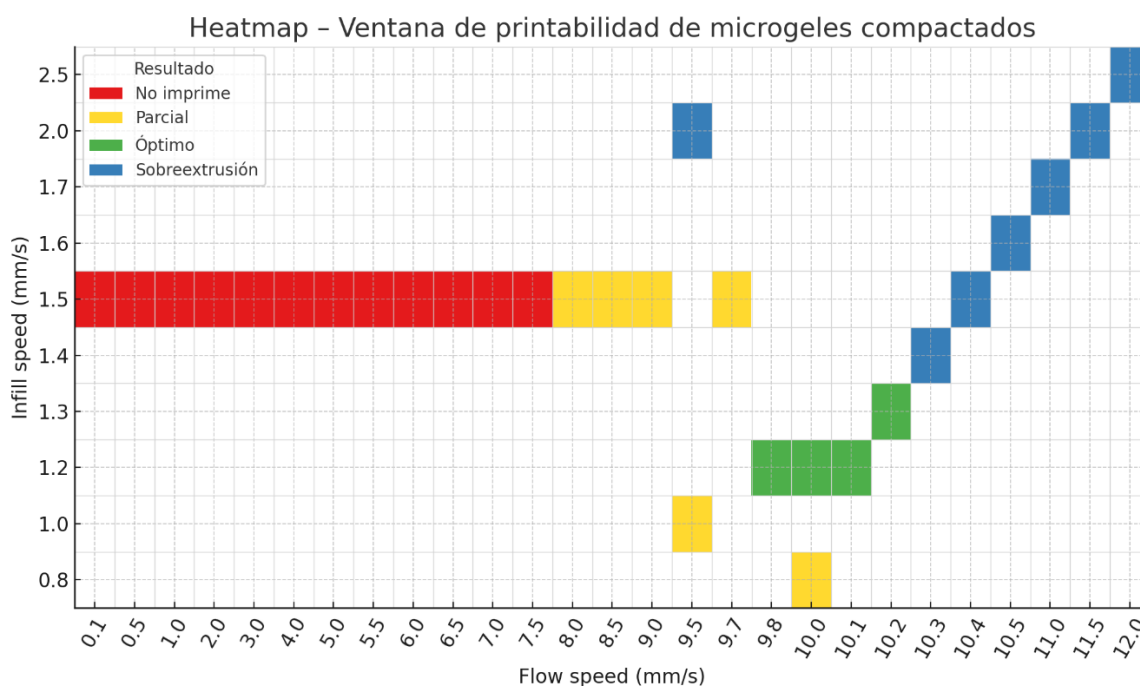


Figura 22: Heatmap que muestra los resultados del estudio de la ventana de printabilidad variando los parámetros de infill y flow speed.

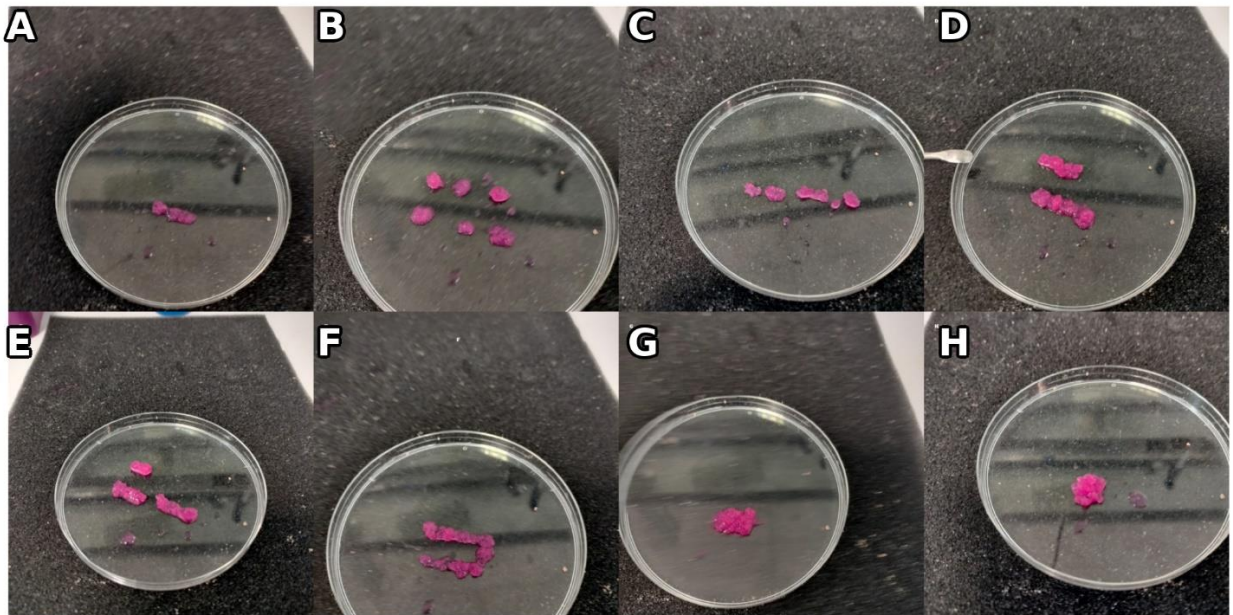


Figura 23: Imágenes del estudio de la printabilidad de los microgeles. (A) Flow speed 8.0 e infill speed 1.5. (B) Flow speed 9.0 e infill speed 1.5. (C) Flow speed 9.0 e infill speed 1.0. (D) Flow speed 9.5 e infill speed 1.0. (E) Flow speed 9.7 e infill speed 1.5. (F) Flow speed 10.0 e infill speed 1.2. (G) Flow speed 10.5 e infill speed 1.6. (H) Flow speed e infill speed 11.5 y 2.0.

El estudio de la ventana de printabilidad de los microgeles compactados permitió identificar con claridad cómo afectan los parámetros de impresión, principalmente *flow speed* e *infill speed*, al comportamiento del material y a la fidelidad de las estructuras obtenidas.

En primer lugar, respecto a la tendencia observada al modificar la *flow speed*, se vio que existe un umbral mínimo por debajo del cual la extrusión es prácticamente nula. Con valores de *flow speed* inferiores a 7,5–8,0 mm/s la impresora no alcanzaba la presión necesaria para vencer la resistencia del material y, en consecuencia, no se generaba filamento alguno. A partir de este punto crítico, comenzaron a aparecer pequeños indicios de extrusión, a 8,0–9,0 mm/s (imagen A de la Figura 23), aunque en forma de tramos muy entrecortados, cortos y con interrupciones frecuentes. Esto indica que el flujo se inicia de manera parcial, pero de manera inestable, sin continuidad en la deposición.

Al seguir aumentando la *flow speed* hacia valores de 9,0–9,5 mm/s (imágenes B, C y D de la Figura 23), se observó un incremento progresivo en la cantidad de material extruido, pero con comportamientos aún irregulares: los microgeles salían en segmentos aislados, o se acumulaba en puntos concretos del recorrido, sin reproducir fielmente el diseño de referencia. Sin embargo, alrededor de 9,7–10,3 mm/s (imagen F de la Figura 23) se alcanzó un rango de trabajo estable en el que el flujo de material fue continuo y homogéneo. Este rango puede considerarse la zona óptima de extrusión, ya que los filamentos obtenidos seguían con precisión el patrón de impresión y presentaban una reproducibilidad elevada. De manera concreta, los valores de 9,8; 10,0 y 10,1 mm/s fueron los más satisfactorios, ya que permitieron generar líneas continuas, sin interrupciones y sin engrosamientos excesivos.

Más allá de 10,4 mm/s, especialmente en los valores de 10,5 mm/s en adelante (imágenes G y H de la Figura 23, en los que se aumenta la *infill speed* a 1.6 y 2.0, respectivamente), se produjo una sobreextrusión: la velocidad era excesiva y el material

era expulsado en exceso, con acumulación al inicio del proceso y formación de filamentos desproporcionados o incluso de grandes depósitos de microgeles. Este comportamiento comprometía por completo la fidelidad geométrica, ya que en lugar de trazar el diseño definido, el material se depositaba de forma irregular en un solo punto o en líneas demasiado gruesas.

En cuanto a la tendencia observada al modificar la *infill speed*, con un valor fijo de flow speed de 10.0 mm/s, se evidenció que este parámetro influye directamente en el grosor y continuidad de los filamentos. A velocidades bajas (0,8–1,0 mm/s), el cabezal avanzaba demasiado despacio respecto a la extrusión, lo que generaba acumulación de material y líneas más gruesas de lo previsto. Por el contrario, a velocidades más altas ($\geq 1,6$ –2,0 mm/s), el cabezal se desplazaba demasiado rápido, lo que no permitía que los microgeles se asentaran de forma uniforme sobre la plataforma, provocando interrupciones en el filamento o depósitos desiguales. El valor de 1,2 mm/s se identificó como el más equilibrado, ya que acompañaba de manera óptima la extrusión y permitía obtener filamentos del grosor adecuado y con continuidad a lo largo del diseño.

En síntesis, la combinación de *flow speed* entre 9,8 y 10,1 mm/s y una *infill speed* de 1,2 mm/s se estableció como la más adecuada, ya que proporcionó un equilibrio óptimo entre fluidez, continuidad y fidelidad geométrica de los filamentos de microgel, reproducidos de manera estable en los ensayos de impresión.

A pesar de la identificación de este rango de parámetros óptimos, el sistema todavía presenta limitaciones que deberían abordarse en trabajos futuros.

En primer lugar, la hidratación de los microgeles es un factor crítico. Los resultados muestran que cuanto más secos se encuentran los microgeles, más difícil resulta su extrusión a través de la aguja, lo que puede impedir la impresión incluso cuando los parámetros de velocidad son correctos. Por el contrario, cuando los microgeles están más hidratados, la extrusión es más sencilla, pero el material se comporta como una suspensión demasiado fluida, dando lugar a líneas más anchas de lo deseado y con menor fidelidad al diseño. Esto revela que el desafío no es únicamente ajustar parámetros de impresión, sino también encontrar un equilibrio en la preparación previa de la biotinta. Optimizar este balance entre compactación y fluidez será fundamental para mejorar la reproducibilidad y la calidad de las impresiones. Como prueba de esto, en la imagen C de la Figura 23, se observa cómo los microgeles estaban menos hidratados de lo normal, y ello afectó a la extrusión y salió menos material del supuesto.

Otro aspecto a tener en cuenta es la adhesión del material a la superficie de impresión. En algunos casos, los filamentos tendían a desplazarse o a acumularse en puntos aislados, lo que sugiere que una optimización de la superficie de impresión o incluso de las condiciones ambientales (humedad, temperatura de la cama, rugosidad del sustrato) podría mejorar el asentamiento inicial del material y, con ello, la fidelidad del diseño.

También es necesario remarcar que los ensayos se realizaron con diseños muy sencillos, donde los patrones de deposición eran básicos. Para impresiones más complejas o tridimensionales, será necesario explorar más a fondo la interacción entre parámetros de impresión y propiedades del biotinta, ya que los requisitos de continuidad y fidelidad geométrica serán mayores. En este sentido, estudios futuros deberían incluir no solo la variación sistemática de *flow speed* e *infill speed*, sino también la evaluación de otros parámetros como la *layer height*, la temperatura de la cama o incluso la modificación del diámetro de las agujas empleadas. Los resultados obtenidos en las pruebas de inyectabilidad ya mostraron diferencias significativas al pasar de PBS a medio de cultivo, lo que sugiere que pequeñas variaciones en la formulación de la biotinta o en el grado de hidratación pueden tener un impacto directo en la fluidez y en

la estabilidad del filamento. Profundizar en todos estos aspectos permitiría lograr un control más preciso sobre el comportamiento del material durante la impresión.

7. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

Durante el desarrollo del TFG:

1. Se ha llevado a cabo la reacción de modificación de dos ELRs, alcanzando un grado de modificación cercano al 60 % de las aminas. Mediante esta estrategia, se introdujeron grupos funcionales reactivos (azidas y ciclooctinos) capaces de participar posteriormente en reacciones de química CLICK al ponerse en contacto. La confirmación de este grado de funcionalización se realizó mediante las técnicas de caracterización RMN y MALDI-ToF.
2. A partir de los polímeros modificados se generaron microgeles mediante la técnica de emulsion batch, cuya reticulación se lleva a cabo mediante enlaces covalentes formados en la reacción tipo CLICK entre los grupos funcionales introducidos, lo que les confiere una adecuada estabilidad mecánica. Estos microgeles demostraron mantener su integridad estructural bajo condiciones de extrusión.
3. Se ha establecido una ventana de printabilidad mediante la optimización de los parámetros de impresión en una impresora 3D, ajustando la velocidad de extrusión, el diámetro de la aguja y las condiciones de compactación de los microgeles, entre otros.

En resumen, los resultados obtenidos en las diferentes pruebas llevadas a cabo durante la realización del trabajo fueron prometedores, demostrando que los microgeles desarrollados durante este TFG presentan unas propiedades adecuadas para su futura aplicación en bioimpresión 3D en el área de ingeniería de tejidos. La línea de investigación continuará dentro del grupo Bioforge para estudiar la aplicación de estos microgeles en la regeneración de tejidos y otras aplicaciones biomédicas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. C. Daly, "Granular Hydrogels in Biofabrication: Recent Advances and Future Perspectives," Oct. 07, 2023, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/adhm.202301388.
- [2] C. Tuftee, E. Alsberg, I. T. Ozbolat, and M. Rizwan, "Emerging granular hydrogel bioinks to improve biological function in bioprinted constructs," Mar. 01, 2024, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.tibtech.2023.09.007.
- [3] T. H. Qazi, V. G. Muir, and J. A. Burdick, "Methods to Characterize Granular Hydrogel Rheological Properties, Porosity, and Cell Invasion," *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 8, no. 4, pp. 1427–1442, Apr. 2022, doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c01440.
- [4] V. G. Muir, T. H. Qazi, J. Shan, J. Groll, and J. A. Burdick, "Influence of Microgel Fabrication Technique on Granular Hydrogel Properties," *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 7, no. 9, pp. 4269–4281, Sep. 2021, doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01612.
- [5] C. B. Highley, K. H. Song, A. C. Daly, and J. A. Burdick, "Jammed Microgel Inks for 3D Printing Applications," *Advanced Science*, vol. 6, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1002/advs.201801076.
- [6] C. B. Highley, K. H. Song, A. C. Daly, and J. A. Burdick, "Jammed Microgel Inks for 3D Printing Applications," *Advanced Science*, vol. 6, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1002/advs.201801076.
- [7] Z. Ataie *et al.*, "Nanoengineered Granular Hydrogel Bioinks with Preserved Interconnected Microporosity for Extrusion Bioprinting," *Small*, vol. 18, no. 37, Sep. 2022, doi: 10.1002/smll.202202390.
- [8] A. Pramanick, T. Hayes, V. Sergis, E. McEvoy, A. Pandit, and A. C. Daly, "4D Bioprinting Shape-Morphing Tissues in Granular Support Hydrogels: Sculpting Structure and Guiding Maturation," *Adv Funct Mater*, Jan. 2024, doi: 10.1002/adfm.202414559.
- [9] C. L. Hedegaard *et al.*, "Hydrodynamically Guided Hierarchical Self-Assembly of Peptide–Protein Bioinks," *Adv Funct Mater*, vol. 28, no. 16, Apr. 2018, doi: 10.1002/adfm.201703716.
- [10] D. F. Duarte Campos *et al.*, "Bioprinting Cell- and Spheroid-Laden Protein-Engineered Hydrogels as Tissue-on-Chip Platforms," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, Apr. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00374.
- [11] J. Chen and X. Zou, "Self-assemble peptide biomaterials and their biomedical applications," Mar. 01, 2019, *KeAi Communications Co.* doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.01.002.
- [12] Y. Sugioka, J. Nakamura, C. Ohtsuki, and A. Sugawara-narutaki, "Thixotropic hydrogels composed of self-assembled nanofibers of double-hydrophobic elastin-like block polypeptides," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 8, Apr. 2021, doi: 10.3390/ijms22084104.
- [13] M. Dai *et al.*, "Elastin-like Polypeptide-Based Bioink: A Promising Alternative for 3D Bioprinting," *Biomacromolecules*, vol. 22, no. 12, pp. 4956–4966, Dec. 2021, doi: 10.1021/acs.biomac.1c00861.
- [14] S. Salinas-Fernández, M. Santos, M. Alonso, L. Quintanilla, and J. C. Rodríguez-Cabello, "Genetically engineered elastin-like recombinamers with

- sequence-based molecular stabilization as advanced bioinks for 3D bioprinting,” *Appl Mater Today*, vol. 18, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.apmt.2019.100500.
- [15] M. Puertas-Bartolomé, D. Venegas-Bustos, S. Acosta, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Contribution of the ELRs to the development of advanced in vitro models,” 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fbioe.2024.1363865.
 - [16] C. M. Madl, L. M. Katz, and S. C. Heilshorn, “Bio-Orthogonally Crosslinked, Engineered Protein Hydrogels with Tunable Mechanics and Biochemistry for Cell Encapsulation,” *Adv Funct Mater*, vol. 26, no. 21, pp. 3612–3620, Jun. 2016, doi: 10.1002/adfm.201505329.
 - [17] S. M. Hull *et al.*, “3D Bioprinting using UNiversal Orthogonal Network (UNION) Bioinks,” *Adv Funct Mater*, vol. 31, no. 7, Feb. 2021, doi: 10.1002/adfm.202007983.
 - [18] Y. Wu *et al.*, “An interfacial self-assembling bioink for the manufacturing of capillary-like structures with tuneable and anisotropic permeability,” *Biofabrication*, vol. 13, no. 3, Jul. 2021, doi: 10.1088/1758-5090/abe4c3.
 - [19] I. González De Torre, M. Santos, L. Quintanilla, A. Testera, M. Alonso, and J. C. Rodríguez Cabello, “Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties,” *Acta Biomater*, vol. 10, no. 6, pp. 2495–2505, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.006.
 - [20] A. Fernández-Colino, F. J. Arias, M. Alonso, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Amphiphilic Elastin-Like Block Co-Recombinamers Containing Leucine Zippers: Cooperative Interplay between Both Domains Results in Injectable and Stable Hydrogels,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 10, pp. 3389–3398, Oct. 2015, doi: 10.1021/acs.biomac.5b01103.
 - [21] S. Acosta, L. Poczka, L. Quintanilla-Sierra, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Charge Density as a Molecular Modulator of Nanostructuration in Intrinsically Disordered Protein Polymers,” *Biomacromolecules*, vol. 22, no. 1, pp. 158–170, Jan. 2021, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00934.
 - [22] L. Ouyang, C. B. Highley, W. Sun, and J. A. Burdick, “A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-crosslinkable Inks,” *Advanced Materials*, vol. 29, no. 8, Feb. 2017, doi: 10.1002/adma.201604983.
 - [23] H. K. Lau *et al.*, “Microstructured Elastomer-PEG Hydrogels via Kinetic Capture of Aqueous Liquid–Liquid Phase Separation,” *Advanced Science*, vol. 5, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.1002/advs.201701010.
 - [24] I. González De Torre, M. Santos, L. Quintanilla, A. Testera, M. Alonso, and J. C. Rodríguez Cabello, “Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties,” *Acta Biomater*, vol. 10, no. 6, pp. 2495–2505, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.006.
 - [25] F. González-Pérez, A. Ibáñez-Fonseca, M. Alonso, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Combining tunable proteolytic sequences and a VEGF-mimetic peptide for the spatiotemporal control of angiogenesis within Elastin-Like Recombinamer scaffolds,” *Acta Biomater*, vol. 130, pp. 149–160, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.06.005.
 - [26] F. González-Pérez, A. Ibáñez-Fonseca, M. Alonso, and J. C. Rodríguez-Cabello, “Combining tunable proteolytic sequences and a VEGF-mimetic peptide for the spatiotemporal control of angiogenesis within Elastin-Like Recombinamer

scaffolds," *Acta Biomater*, vol. 130, pp. 149–160, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2021.06.005.

