



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ  
UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

Facultad de Ciencias e Ingeniería

*Arquitectura metodológica para la evaluación sistemática y la optimización funcional de materiales en procesos de bioimpresión 3D mediante la tecnología CELLINK BIO-X*

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Biomédico

*que presenta:*

**Autor:** Lizardo Kendy Torres Ayala

**Asesor:** Dr. Denis Helan Castillo Pareja

**Lugar:** Lima, Perú

**Fecha:** 13 de junio de 2025

## Resumen

En Perú, la baja tasa de donación efectiva (1.6 por millón) sigue dejando a cientos de pacientes sin acceso real al trasplante[1, 2]. La bioimpresión 3D surge como alternativa: fabricar tejidos funcionales desde biomateriales. Sin embargo, mientras los equipos avanzan, los bioinks carecen aún de criterios estandarizados para su selección y evaluación[3, 4]. Esta tesis no propone un nuevo material, sino una nueva forma de estudiarlos. A través del análisis de variables operativas como presión y velocidad, busca transformar el ensayo empírico en evidencia cuantificable. Establecer una arquitectura metodológica permitirá seleccionar bioinks de forma reproducible, avanzar en estandarización técnica y dar el siguiente paso: imprimir con precisión antes de curar con tejidos.

**Palabras clave:** Bioimpresión 3D, biomateriales, hidrogeles, estandarización, ingeniería de tejidos, CELLINK BIO X.

# CAPÍTULO 1

## Fundamentos de la Propuesta Metodológica

### 1.1. Introducción

La escasez de órganos es una de las paradojas más crudas de la medicina moderna mundial: el médico sabe cómo salvar vidas, pero no siempre tiene con qué. En Estados Unidos más de 110,000 pacientes integraban la lista nacional de espera para trasplantes al cierre del 2022[5]. En Perú la cifra de donantes por cada millón de habitantes fue de 1.6, con 5,970 personas en espera, 711 trasplantes realizados y más de 700 muertes estimadas por falta de órganos solamente el año 2017[1, 2]. Aunque la normativa peruana establece un sistema de consentimiento presunto(opt-out), en la práctica el 63 % de las familias rechaza autorizar la donación[2], la ley permite el procuramiento únicamente tras muerte encefálica, excluyéndose otras modalidades hasta ser robustamente reguladas[1]. Este desajuste cultural-legislativo limita el acceso al trasplante y acentúa el dilema ético del trasplante alogénico. Ante ello, la ingeniería de tejidos plantea una solución estructural a largo plazo: desarrollar sustitutos biológicos anatómico-funcionales sin depender de la muerte de un paciente.

Además de esta visión a largo plazo, la ingeniería de tejidos también propone soluciones inmediatas en el campo preclínico. A corto plazo, la ingeniería de tejidos busca desarrollar modelos fármaco-toxicológicos funcionales que reproduzcan con mayor fidelidad la biomimética estructural, superando las limitaciones de los modelos *in vitro* en placa 2D y evitando las tensiones éticas asociadas al uso de animales[6].

Una tecnología de manufactura poderosa que permite la replicación y traslación de

productos médicos de ingeniería tisular es la bioimpresión 3D dado que permite trabajar con células, moléculas de señalización y biomateriales bajo un control espacial y temporal completo[7, 8, 6].

Los biomateriales empleados como matriz principal en bioimpresión aún requieren ser optimizados y validados para aplicaciones específicas, lo que mantiene a esta tecnología en fases tempranas de desarrollo, dominada por esquemas de prueba y error que dificultan la estandarización y la reproducibilidad de resultados [3]. Esta fragmentación metodológica limita el avance hacia niveles superiores de preparación tecnológica (TRL), especialmente en el diseño y escalamiento de materiales con potencial de aplicación clínica o comercial [4]. La caracterización funcional de estos materiales suele realizarse de forma empírica o mediante pruebas ad-hoc, sin un marco sistemático que facilite un screening rápido y comparativo. En respuesta, esta tesis propone un enfoque centrado en el análisis cuantitativo del comportamiento de impresión directamente desde la bioimpresora, utilizando variables operativas como presión, caudal y velocidad como criterios de estandarización funcional. Autores como Rau et al. han demostrado, mediante reometría, que un material de extrusión debe cumplir tres criterios esenciales: fluir sin bloquear jeringas ni generar inestabilidades, solidificarse rápidamente para mantener su forma tras la deposición y resistir deformaciones post-extrusión [9, 10]. Este tipo de evaluación estructurada, replicable y alineada con los principios del TRL permite avanzar hacia una ingeniería racional de biomateriales centrada en el desempeño físico-funcional.

## 1.2. Pregunta de investigación e hipótesis

Esta tesis propone responder la pregunta: *¿En qué medida una arquitectura metodológica de evaluación sistemática basada en parámetros operativos de impresión permite realizar un screening rápido y reproducible del comportamiento estructural de materiales sintetizados en laboratorio para bioimpresión 3D por extrusión?*

Hipótesis: El desarrollo de una arquitectura metodológica de evaluación sistemática permitirá llevar a cabo un proceso de screening rápido, reproducible y orientado al desempeño estructural de materiales sintetizados en laboratorio para bioimpresión 3D por extrusión, facilitando su selección y optimización técnica desde parámetros operativos del propio sistema de impresión.

### 1.3. Objetivos

#### Objetivo general

Desarrollar una arquitectura metodológica de evaluación sistemática que permita realizar un screening rápido, funcional y reproducible del comportamiento estructural de materiales sintetizados en laboratorio para bioimpresión 3D por extrusión, empleando variables operativas obtenidas directamente desde la plataforma CELLINK BIO-X.

#### Objetivos específicos

- Diseñar un toolbox de hidrogeles híbridos de uso común en bioimpresión por extrusión (alginato, gelatina, goma xantana, quitosano y colágeno), organizando sus propiedades estructurales relevantes para su evaluación funcional.
- Caracterizar la capacidad de extrusión inicial de los hidrogeles mediante dispensación controlada con jeringas convencionales y boquillas de calibre 22G y 27G, a fin de identificar formulaciones viables para procesos posteriores.
- Analizar el desempeño operativo de los hidrogeles seleccionados mediante la parametrización de velocidad y presión en la plataforma CELLINK BIO-X, con el objetivo de cuantificar su comportamiento durante la extrusión.

- Evaluar la estabilidad estructural inmediata de los materiales bajo condiciones óptimas de impresión, considerando su capacidad de recuperación post-extrusión y resistencia frente a la deformación por gravedad.
- Imprimir un modelo anatómico complejo (oreja humana) con los hidrogeles que presenten el mejor desempeño estructural, validando funcionalmente el proceso de selección metodológica.

#### 1.4. Materiales y Métodos

Se emplearán biopolímeros, reactivos y equipos específicos para la preparación de bioinks híbridos y su procesamiento mediante bioimpresión por extrusión.

Se usará gelatina tipo B (G9391, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), quitosano extraído de exoesqueletos de *Hermetia illucens* mediante desacetilación alcalina en el Laboratorio de Química de la Vida (LAVI-UPCH), ácido acético glacial (Merck, Alemania), goma xantana (Bob's Red Mill, Milwaukie, OR, USA) y alginato de sodio (A2033, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se preparará una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ , 1311-01, J.T. Baker, USA) a 100 mM. Los moldes para ensayos estructurales se fabricarán con ácido poliláctico (PLA, Prusament, Prusa Research, República Checa) mediante impresión 3D por deposición fundida (FDM).

La bioimpresión se realizará en una BIO X (Cellink, Suecia) con jeringas estándar de 3 mL (Cellink) y boquillas de calibre 22G y 27G (Cellink). Se utilizarán conectores hembra-hembra Luer-Lock para acoplar los componentes. Las estructuras se imprimirán sobre cajas Petri plásticas estériles. También se emplearán extrusores manuales tipo jeringa para evaluaciones preliminares de extrudabilidad utilizando las mismas boquillas.

Cada uno de los objetivos planteados será abordado mediante procedimientos experimentales y técnicos específicos que permiten resolverlos de manera secuencial y funcional. A continuación, se enumeran los ejes metodológicos que guían el desarrollo

del trabajo:

#### **1.4.1. Diseñar un *toolbox* de hidrogeles híbridos (alginato, gelatina, goma xantana, quitosano, colágeno) para bioimpresión por extrusión, organizando sus propiedades estructurales relevantes.**

La primera etapa de este trabajo se centrará en el diseño de un *toolbox* de materiales para bioimpresión 3D mediante la selección y combinación racional de biopolímeros ampliamente utilizados: alginato, gelatina, goma xantana, quitosano y colágeno.

Se aplicará el enfoque de ingeniería de diseño según la directriz VDI 2206, que propone una arquitectura sistemática para el desarrollo de soluciones técnicas en base a requerimientos funcionales. Esta metodología, originalmente desarrollada para el diseño de sistemas mecatrónicos, puede ser adaptada como marco estructurado para la selección de biopolímeros destinados a la bioimpresión 3D, incluso en contextos sin validación experimental directa. Mediante su modelo en V, esta directriz permite organizar el proceso en fases claras: primero, se definen los requisitos funcionales y fisicoquímicos del bioink según la aplicación prevista (como compatibilidad celular, propiedades reológicas y resolución de impresión). Luego, se realiza una evaluación comparativa interdisciplinaria basada en datos extraídos de la literatura, analizando biopolímeros en función de parámetros como viscosidad, tixotropía, métodos de reticulación y desempeño en impresoras específicas. Finalmente, se integran los hallazgos y se valida la selección mediante razonamiento técnico y trazabilidad bibliográfica. Esta adaptación permite tomar decisiones fundamentadas y reproducibles para el diseño de bioinks y es especialmente útil en fases preliminares de investigación o diseño conceptual. En este caso, se priorizará la respuesta estructural de los materiales[11, 12]. La metodología consistirá en identificar atributos clave para cada polímero:

- **Alginato:** excelente capacidad de gelificación iónica con  $\text{Ca}^{2+}$  y formación rápida de redes *egg-box*, ideal para mantener estructura post-extrusión [13, 3].

- **Gelatina:** térmicamente reversible, conferirá viscosidad y soporte estructural frente a variaciones de temperatura[14].
- **Goma xantana:** reológicamente moduladora, otorgará pseudoplasticidad y mejorará la manejabilidad de las tintas [15, 16].
- **Quitosano:** aportará actividad antibacteriana y potencial estructural por interacciones electrostáticas[17].
- **Colágeno:** proporcionará sitios de unión celular (integrinas), sin comprometer la estabilidad mecánica [18].

Con estos criterios, se diseñará un mapa de combinaciones binarias y ternarias, priorizando sinergias estructurales (e.g., alginato-xantana-gelatina). Las formulaciones se prepararán en proporciones entre 1 % y 4 % p/v en agitación magnética durante 8 horas y se almacenaran overnight a 4 grados hasta su uso.

#### **1.4.2. Evaluar la capacidad de extrusión mediante jeringas convencionales y boquillas 22G y 27G.**

Antes de iniciar la caracterización reológica detallada y los ensayos de bioimpresión, se realizó una evaluación preliminar manual de la extrudabilidad con el fin de refinar la selección de formulaciones candidatas. Este cribado cualitativo se basó en una estrategia adaptada de [19], con modificaciones específicas según los materiales y objetivos de este estudio. Si bien no constituye un método cuantitativo, esta prueba representa una herramienta práctica y eficiente para evaluar rápidamente el comportamiento de extrusión, especialmente útil durante las etapas tempranas de optimización o al comparar diferentes sistemas poliméricos.

Cada hidrogel será cargado en jeringas convencionales de 5ml, asegurando la eliminación completa de burbujas de aire para evitar irregularidades en el flujo. La extrusión manual se llevó a cabo utilizando boquillas de calibre 27G y 20G,

seleccionadas por su correspondencia con condiciones comunes de bio impresión. La evaluación se centrará en tres criterios clave: la continuidad y suavidad del flujo durante la extrusión, la ausencia de fugas o bloqueos en la punta de la boquilla, y la capacidad del material para mantener su forma tras la extrusión sin colapsar ni extenderse en exceso.

A pesar de su naturaleza cualitativa, esta evaluación preliminar bajo criterios prácticos de ingeniería será fundamental para identificar formulaciones con propiedades de manejo aceptables y señales tempranas de imprimibilidad. Al reducir el número de candidatos, este enfoque mejorará significativamente la eficiencia del proceso de optimización, asegurando que solo los bioinks con características de flujo y fidelidad de forma adecuadas serán seleccionados para las siguientes etapas de caracterización.

#### **1.4.3. Parametrizar presión y velocidad de impresión en CELLINK BIO-X para los hidrogeles seleccionados.**

Se llevará a cabo la optimización de los parámetros de bio impresión empleando la impresora BIO X (Cellink), utilizando exclusivamente aquellas formulaciones que hayan superado la evaluación preliminar de extrudabilidad. Se diseñará un G-code personalizado que permitirá controlar de forma precisa tanto la presión como la velocidad de impresión, evitando la dependencia del software de corte convencional y garantizando condiciones mecánicas reproducibles [20, 21].

La presión neumática será evaluada en un rango de 0.1 a 120 psi, ajustándose según los requerimientos específicos de cada bioink con base en sus propiedades reológicas. Por otro lado, se analizarán velocidades de impresión de 1, 4, 7 y 10 mm/s, seleccionadas por criterios prácticos relacionados con el control del trazo y la resolución. Cada extrusión se realizará manteniendo el mismo z-step de 0.2 um. Estas condiciones permitirán establecer una ventana operativa robusta para cada formulación, manteniéndose dentro del régimen viscoelástico lineal y minimizando el riesgo de daño estructural.

Los filamentos resultantes serán capturados bajo condiciones ópticas constantes y

analizados en ImageJ, aplicando mediciones triplicadas por configuración. Los datos se procesarán con scripts en Python, permitiendo cuantificar la influencia de la presión y la velocidad sobre el ancho del filamento, la uniformidad del trazo y la fidelidad global de impresión.

#### **1.4.4. Analizar estabilidad estructural post-extrusión considerando recuperación de forma y deformación frente cargas estructurales**

Con el fin de evaluar cuantitativamente la fidelidad geométrica y la estabilidad estructural de los andamios bioimpresos, se empleará un diseño de patrón de macroporos basado en un G-code personalizado, el cual generará una arquitectura en malla entrecruzada. Al variar sistemáticamente el espaciado entre hebras horizontales y verticales, se obtendrán macroporos de distintas dimensiones, lo que permitirá analizar la fidelidad de forma mediante un índice de imprimibilidad ( $Pr$ ), definido como:

$$Pr = \frac{L^2}{16A} \quad (1.1)$$

donde  $L$  es el perímetro y  $A$  el área del poro impreso [22, 23]. Valores de  $Pr$  cercanos a 1 se considerarán óptimos, ya que indican mínima deformación o colapso, mientras que valores mayores reflejan irregularidades por expansión o fusión de filamentos.

A nivel funcional, la correcta formación de macroporos influye tanto en la robustez mecánica como en aspectos biológicos como el transporte de masa y la distribución celular. Por ello, los patrones impresos se analizarán en *ImageJ* bajo condiciones ópticas constantes, y los valores de  $Pr$  se calcularán sobre múltiples regiones de cada muestra. Los parámetros de impresión (presión y velocidad) serán ajustados previamente según las propiedades reológicas de cada formulación, con el objetivo de mantener condiciones controladas de deposición.

Finalmente, se ejecutará un ensayo de colapso utilizando una fijación personalizada, imprimiendo hebras sobre puentes sin soporte de 1 a 6 mm. La deformación resultante se cuantificará mediante el Índice de Colapso ( $C_f$ ), definido como:

$$C_f = \frac{A_{t_c} - A_{a_c}}{A_{t_c}} \times 100 \% \quad (1.2)$$

donde  $A_{t_c}$  es el área teórica del puente y  $A_{a_c}$  el área medida tras la impresión [24, 25]. Esta metodología integrada permitirá determinar si las formulaciones seleccionadas presentan la integridad mecánica necesaria para mantener estructuras complejas impresas por extrusión.

#### **1.4.5. Imprimir un modelo anatómico complejo con los hidrogeles mejor evaluados.**

Como fase final del estudio, se procederá a la impresión de modelos anatómicos complejos empleando las formulaciones hidrogel seleccionadas con el mejor desempeño en las pruebas de extrudabilidad, fidelidad geométrica y estabilidad estructural. Esta etapa permitirá validar la aplicabilidad práctica de los bioinks en contextos biomédicos exigentes, replicando geometrías que representen estructuras tisulares con relevancia clínica.

Para este fin, se utilizará un modelo tridimensional de pabellón auricular humano descargado de la plataforma Cults3D, desarrollado por 3DPrintBunny [26]. Este archivo en formato STL será procesado mediante software de segmentación y slicing compatible con la impresora BIO X, respetando las proporciones anatómicas y conservando detalles geométricos relevantes para evaluar la resolución y precisión de impresión.

Los parámetros de impresión (presión, velocidad, temperatura y altura de capa) se seleccionarán según los valores óptimos previamente determinados para cada hidrogel. Posteriormente, se realizará una evaluación visual y dimensional del constructo impreso, analizando su fidelidad morfológica e integridad estructural. Esta fase busca confirmar

que las formulaciones seleccionadas no solo son técnicamente imprimibles, sino que además poseen la capacidad de reproducir estructuras anatómicas complejas con alta precisión, condición necesaria para su futura aplicación en ingeniería de tejidos personalizada.

## **Consideraciones de bioseguridad y gestión de riesgos**

Las actividades del presente proyecto se desarrollarán en dos espacios experimentales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH): el Laboratorio de Química de la Vida (LAVI), y el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos. La preparación de las formulaciones hidrogel se llevará a cabo en el LAVI-LID, mientras que las pruebas de impresión y análisis estructural se ejecutarán en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, el cual cuenta con la bioimpresora BIO X (Cellink) y está clasificado como instalación de Nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2), de acuerdo con las directrices internacionales aplicables a entornos que manipulan materiales biológicos de bajo a moderado riesgo.

Aunque este estudio no contempla el uso de células vivas, la manipulación de biopolímeros como quitosano, colágeno, alginato y goma xantana requiere condiciones asépticas que prevengan la contaminación cruzada y aseguren la reproducibilidad experimental. Por ello, se aplicará lo estipulado en la norma ISO 15190:2003, que establece el uso obligatorio de equipos de protección personal (guantes, gafas, mascarillas, batas), así como protocolos de desinfección de superficies y equipos con etanol al 70 % o hipoclorito de sodio al 10 % [27].

Todos los insumos en contacto con las formulaciones, incluidos jeringas, pistones, cartuchos y boquillas, deberán estar estériles o ser esterilizados por autoclave o tratamiento químico, conforme a la norma ISO 13485:2003 sobre dispositivos médicos [28]. La BIO X cuenta, además, con sistema UV y filtro HEPA integrado, que será activado antes de cada sesión de trabajo para mantener condiciones de esterilidad.

Las pruebas de impresión se regirán por la norma ASTM F3659-24, la cual proporciona

directrices para evaluar la seguridad, eficacia y respuesta estructural de los hidrogeles utilizados por bioimpresión 3D[29]. Aunque la presente investigación no incluye células ni componentes bioactivos, se aplicarán estos criterios para asegurar la calidad físico-funcional de los constructos.

Para la gestión de residuos, se seguirán los lineamientos de la norma ASTM E3051-16. Los residuos sólidos —como boquillas, puntas de jeringa y guantes— serán clasificados por nivel de riesgo y descartados en contenedores debidamente etiquetados. El material punzocortante será eliminado inmediatamente después de su uso en contenedores rígidos resistentes a perforaciones, sin reencapsulado ni manipulación directa, y posteriormente esterilizado mediante autoclave previo a su disposición final [30, 31, 32].

El manejo de reactivos como ácido acético se llevará a cabo bajo las normas OSHA e ISO, utilizando campanas extractoras, guantes resistentes, gafas de seguridad, ventilación adecuada y almacenamiento en gabinetes ventilados con etiquetado reglamentario [33]. Asimismo, el laboratorio estará equipado con kits de contención y neutralización de derrames químicos.

Finalmente, todos los equipos críticos (bioimpresora, cabina de bioseguridad clase II, autoclave, estufa) estarán sujetos a un programa de mantenimiento preventivo trimestral, en cumplimiento con las normas ISO 15190:2003 e ISO 35001:2019 [34]. Este incluye limpieza, verificación operativa, calibración y documentación de cada intervención. Antes de cada sesión experimental, el tesista deberá realizar una inspección visual e higienización del entorno de trabajo.

## **1.5. Cronograma de trabajo**

Para asegurar una ejecución organizada y eficiente del proyecto, se ha diseñado un cronograma detallado de actividades distribuido en un período de doce semanas. Este plan contempla la superposición realista de tareas, permitiendo el avance simultáneo en etapas complementarias como la evaluación preliminar de extrudabilidad, la

parametrización operativa en la plataforma BIO X y el análisis estructural. El cronograma refleja la naturaleza iterativa del proceso de optimización, en el que las formulaciones seleccionadas pueden ser evaluadas y refinadas en paralelo. A continuación, se presenta el diagrama correspondiente, que resume las fases de trabajo y sus respectivos plazos de ejecución.

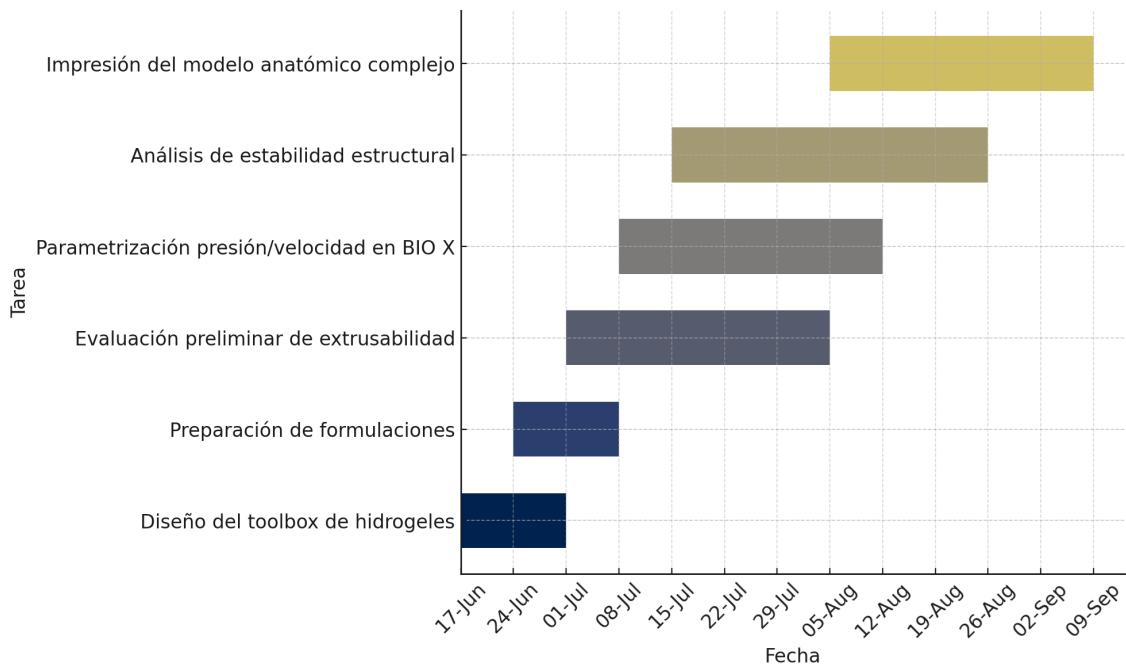


Figura 1.1: Cronograma de trabajo propuesto (diagrama de Gantt).

## 1.6. Presupuesto y fuentes de financiamiento

El presente proyecto contará con financiamiento mixto. Los materiales consumibles serán **autofinanciados** por el tesista, mientras que los equipos especializados —incluyendo la bioimpresora BIO X, boquillas, jeringas Cellink, extrusores y conectores— serán proporcionados por el **Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (UPCH)**. El quitosano será suministrado por el **Laboratorio de Química de la Vida (LAVI-UPCH)**.

<b>Ítem</b>	<b>Costo unitario (S/)</b>	<b>Costo total (S/)</b>
Gelatina tipo B (100 g, Sigma-Aldrich)	320.00	320.00
Alginato de sodio (100 g, Sigma-Aldrich)	280.00	280.00
Goma xantana (227 g, Bob's Red Mill)	60.00	60.00
Ácido acético glacial (500 mL, Merck)	95.00	95.00
Cloruro de calcio (500 g, J.T. Baker)	80.00	80.00
Quitosano (suministrado por LAVI-UPCH)	0.00	0.00
Bioimpresora BIO X (Cellink, UPCH)	0.00	0.00
Jeringas Cellink (3 mL, x10, UPCH)	0.00	0.00
Boquillas 22G y 27G (Cellink, UPCH)	0.00	0.00
Extrusores manuales con conectores (UPCH)	0.00	0.00
Cajas Petri plásticas estériles (x50)	1.50	75.00
Filamento PLA para FDM (1 kg, Prusament)	160.00	160.00
Servicios de impresión 3D FDM (outsourcing)	100.00	100.00
Suministros de laboratorio (guantes, tubos, puntas, etc.)	100.00	100.00
<b>Total estimado</b>		<b>1,270.00</b>

Tabla 1.1: Presupuesto estimado para el desarrollo de la tesis.

### Declaración sobre la elaboración y revisión del manuscrito

Se utilizó la herramienta de inteligencia artificial ChatGPT (OpenAI) como apoyo para la corrección de estilo y revisión gramatical del presente documento. Todas las ideas, análisis y planteamientos científicos presentados son originales del autor. Cualquier contenido conceptual o bibliográfico proveniente de terceros ha sido debidamente citado conforme a las normas académicas correspondientes.

## CAPÍTULO 2

### Marco teórico y estado de la cuestión

Este capítulo presenta los fundamentos conceptuales y técnicos que sustentan el desarrollo metodológico de esta tesis. Se revisan los biopolímeros más empleados en bioimpresión por extrusión, los criterios funcionales que determinan su comportamiento estructural y los enfoques comunes de evaluación operativa. Aunque no se propone un nuevo material, esta investigación se distingue por organizar y sistematizar prácticas dispersas, integrándolas en una arquitectura de análisis funcional reproducible y orientada al desempeño.

#### 2.1. Biopolímeros empleados en bioimpresión por extrusión

El empleo de biomateriales para tratar patologías o traumas bajo el enfoque de la ingeniería de tejidos o la medicina regenerativa no es, en absoluto, una novedad. Hace ya más de tres mil años, los egipcios utilizaban el \*catgut\*, un material derivado de la submucosa de tejidos gástricos, compuesto principalmente por colágeno, elastina y otras lipoproteínas [35]. Sin embargo, no fue sino hasta el siglo XX que se comprendió la verdadera naturaleza de los polímeros como macromoléculas covalentes repetitivas y no meros aglomerados coloidales [36]. Este cambio de paradigma, acompañado del desarrollo de técnicas de moldeo y compatibilidad química, permitió su aplicación extensiva durante y después de la Segunda Guerra Mundial, no solo como suturas, sino también como catéteres y válvulas cardíacas [37].

En 1960, Otto Wichterle y Drahoslav Lím se embarcaron en la búsqueda de un polímero

que facilitara el transporte de metabolitos a través de membranas inteligentes; materiales capaces de absorber agua, hincharse y, al degradarse, no desencadenar una respuesta inflamatoria violenta. Así nació el HEMA (hidroximetilmacrilato, o más precisamente, 2-hidroxietil metacrilato), una red polimérica reticulada, suave, permeable, flexible y biocompatible. Esta innovación marcó un hito: pronto se adoptó en lentes de contacto blandas, recubrimientos de implantes, sistemas de liberación de fármacos, y eventualmente, como base para hidrogeles biofuncionalizados [38, 39].

Su historia no terminó allí. En 1976, Robert Langer propuso su uso como vehículo para la liberación controlada de fármacos, aprovechando mecanismos de difusión no ficeanos mediados por la microporosidad, deformación y relajación del esqueleto molecular [40]. Más adelante, en 2003, Thomas Boland modificó una impresora de escritorio HP para permitir la deposición precisa de células vivas mediante inyección controlada. Este gesto sencillo casi artesanal lo convirtió en el pionero de la bioimpresión tridimensional [41].

El auge académico de esta tecnología de manufactura se consolidó entre los años 2010 y 2015, con publicaciones de alto impacto lideradas por investigadores como Gabor Forgacs, Anthony Atala y Jennifer Lewis, quienes demostraron la posibilidad de imprimir tejidos complejos con estructuras vasculares funcionales [42, 43, 44]. Paralelamente, surgieron las primeras bioimpresoras comerciales Organovo, Cellink y Allevi marcando el inicio de su industrialización [45].

Con ello, el uso de biopolímeros como el alginato, la gelatina, el quitosano, el colágeno y la goma xantana se consolidó en la literatura científica, tanto por sus propiedades reológicas como por su compatibilidad celular [46, 47, 48, 49]. Estos materiales serán abordados en el presente trabajo de tesis, y a continuación se analizarán en detalle sus propiedades y aplicaciones específicas en bioimpresión por extrusión.

### **2.1.1. Alginato de sodio**

El alginato es un polisacárido lineal extraído de algas marrones, compuesto por unidades  $\beta$ -D-manurónico (M) y  $\alpha$ -L-gulurónico (G), dispuestas en bloques M–M, G–G y M–G. A pH fisiológico presenta carga negativa por la ionización de sus grupos carboxilo, permitiendo el entrecruzamiento iónico con  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el modelo “egg-box”, principalmente entre residuos G–G [13, 50, 3]. El hidrogel resultante es biocompatible, pero con baja resistencia mecánica y adhesividad celular, lo que justifica su combinación con otros polímeros para mejorar sus propiedades estructurales y biológicas. Ha sido ampliamente empleado en bioimpresión tridimensional para regeneración ósea, dérmica y cartilaginosa, apóitos, cultivos celulares y sistemas de liberación de fármacos [51, 52].

### **2.1.2. Gelatina**

Derivada por hidrólisis del colágeno, la gelatina pierde su estructura helicoidal triple, pero conserva capacidad para formar geles termo-reversibles mediante enlaces de hidrógeno. Es biocompatible, ligeramente aniónica a pH fisiológico y contiene secuencias RGD que favorecen la adhesión celular. Su baja estabilidad a 37 °C exige modificaciones como GelMA o mezclas con polímeros como alginato o quitosano para bioimpresión estructuralmente estable [53, 54]. Ha sido aplicada en la ingeniería de tejidos de piel, hígado, cartílago y sistemas de liberación controlada.

### **2.1.3. Goma xantana**

La goma xantana es un polisacárido aniónico secretado por *Xanthomonas campestris*, con una cadena principal de D-glucosa y ramificaciones de ácido D-glucurónico y manosas. Su estructura tridimensional le confiere alta viscosidad y comportamiento pseudoplástico. A pH fisiológico, los grupos carboxilo le otorgan carga negativa, permitiendo interacciones con cationes o polímeros catiónicos. Su uso combinado con

agarosa ha demostrado mejorar la fidelidad de impresión sin post-tratamiento, y se emplea como matriz inerte en bioimpresión neuronal [55, 56].

#### **2.1.4. Quitosano**

El quitosano, derivado de la desacetilación de la quitina, está compuesto por D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. A pH ácido, sus grupos amino se protonan, otorgándole carga positiva y solubilidad en agua. Puede entrecruzarse físicamente con TPP o térmicamente con  $\beta$ -GP para formar hidrogeles inyectables, o covalentemente con genipina para mayor rigidez [57, 58]. Posee propiedades antibacterianas, hemostáticas y quelantes, y se ha aplicado en bioimpresión hepática y del sistema nervioso central.

#### **2.1.5. Colágeno**

El colágeno, especialmente el tipo I, es una proteína estructural que forma hélices triples con motivos RGD y GFOGER que favorecen la adhesión celular. Aunque es biocompatible, sufre contracción celular al ser impreso, lo que compromete la estabilidad estructural. Para contrarrestarlo, se emplean estrategias como el entrecruzamiento con riboflavina o su mezcla con ácido hialurónico, logrando mantener la forma y viabilidad celular en modelos cardíacos impresos con hiPSC [59, 60].

A continuación, se presenta un resumen comparativo de los principales hidrogeles naturales utilizados en bioimpresión tridimensional por extrusión. Cada uno de estos biomateriales se caracteriza por una estructura química específica que condiciona su comportamiento fisicoquímico, su carga neta en condiciones fisiológicas, y por ende, su capacidad de formar hidrogeles estables y biocompatibles. Esta tabla sintetiza sus ventajas funcionales, limitaciones técnicas y las referencias más relevantes extraídas de la literatura científica utilizada en este trabajo.

**Tabla 2.1: Comparación estructural y funcional de biopolímeros utilizados en bioimpresión 3D por extrusión.**

Biopolímero	Estructura química	Carga	Tipo de entrecruzamiento	Ventajas	Limitaciones	Bioimpresión	Modific.	Aplicaciones	Referencias
Alginato	Ácido $\beta$ -D-manurónico y $\alpha$ -L-gulurónico (M-G)	Negativa	Iónico con $\text{Ca}^{2+}$	Gelifica rápido, poroso, biocompatible	Poca adhesión celular	Sí	Sí	Regeneración ósea, piel, cartílago, DDS	[13, 50, 51, 52]
Gelatina	Derivado de colágeno (Gly-Pro-Hyp)	Neutra / leve negativa	Física / química (GelMA, TG, GA)	Bioactiva, RGD, suave	Baja estabilidad térmica	Sí	Sí	Piel, hígado, cartílago, fármacos	[53, 54]
Goma xantana	Glucosa + trisacárido lateral (GlcA-Man-Man-pir)	Negativa	Física, electrostática	Alta viscosidad, pseudoplástica	Poca adhesión celular	Sí	Parcial	Modelos neuronales, soporte estructural	[55, 56]
Quitosano	D-glucosamina + N-acetilglucosamina (DD variable)	Positiva	Electrostática (TPP), térmica ( $\beta$ -GP), covalente	Antibacteriano, hemostático, gelifica in situ	Insoluble a pH neutro	Sí	Sí	Regeneración hepática, cartílago, SNC	[57, 58]
Colágeno	Hélice triple ( $2\alpha_1$ , $1\alpha_2$ ) con RGD, GFOGER	Neutra	Física, fotoquímica (riboflavina)	Bioactivo, adhesión celular, autoensamblaje	Contracción celular, estructura débil	Sí	Sí	Corazón, piel, vasos	[59, 60]

## 2.1.6. Razonamiento para combinaciones estructurales

La integración de múltiples biopolímeros en formulaciones compuestas responde a la necesidad de equilibrar propiedades fisicoquímicas y biofuncionales específicas, difíciles de encontrar en un solo material. Por ejemplo, la rápida gelificación iónica del alginato contrasta con su escasa adhesividad celular [13, 3], mientras que polímeros como la gelatina o el colágeno proveen dominios bioactivos pero son térmicamente inestables a 37 °C [53, 59]. Otros materiales como la goma xantana o el quitosano aportan comportamiento pseudoplástico, propiedades antibacterianas o interacciones iónicas que mejoran la reología y funcionalidad de la mezcla [56, 57]. La combinación estratégica de estas características permite formular bioinks más robustos, imprimibles y biocompatibles, con mejor desempeño mecánico, estructural y biológico.

Este proceso de formulación no será abordado de forma empírica, sino bajo una lógica de ingeniería fundamentada en la directriz VDI 2206, que permite estructurar el diseño de sistemas mecatrónicos como las tintas bioimpresas en función de requerimientos, validaciones cruzadas y toma de decisiones iterativa [11, 12]. Así, se plantea un marco metodológico que guíe la selección racional de combinaciones binarias o ternarias, garantizando reproducibilidad, trazabilidad bibliográfica y adecuación al tipo de tejido objetivo.

## **2.2. Propiedades estructurales requeridas por las tintas de biomaterial**

Aunque ampliamente empleados, los biopolímeros descritos aún presentan limitaciones que requieren optimización, manteniendo a la bioimpresión en una etapa incipiente caracterizada por enfoques empíricos que limitan la estandarización y comprometen la reproducibilidad experimental [19].

Existen diversas tecnologías y métodos de bioimpresión, como la estereolitografía, la inyección de tinta y la bioimpresión asistida por láser. No obstante, la más ampliamente utilizada en aplicaciones con hidrogeles es, sin duda, la escritura directa con tinta (Direct Ink Writing, DIW) por extrusión [8, 6]. Esta técnica permite la deposición controlada del bioink a través de un sistema de extrusión, que puede operar mediante presión neumática, tornillo rotatorio u otros mecanismos, según las propiedades reológicas del material[19].

Rau et al. (2023) definieron tres subfunciones críticas que un material debe cumplir para ser exitosamente procesado mediante escritura directa con tinta (DIW). La primera es la extrusión, que implica que el material pueda fluir de manera continua a través del canal de salida (boquilla) sin obstrucciones. Para ello, el bioink debe exhibir un comportamiento no newtoniano, típicamente pseudoplástico, caracterizado por una transición sol-gel. Esto le permite fluir bajo altos esfuerzos cortantes y recuperar su viscosidad en reposo tras la deposición. Esta transición funcional está directamente relacionada con la segunda subfunción: solidificación, que requiere que el material retenga su forma inmediatamente después de ser depositado, evitando deformaciones por escorrimiento. Finalmente, la tercera subfunción es el soporte de capas, que evalúa si el material solidificado puede sostener el peso de capas adicionales sin colapsar, garantizando la estabilidad estructural de la impresión tridimensional [10, 9]. Se presenta a continuación un esquema sencillo de lo mencionado:

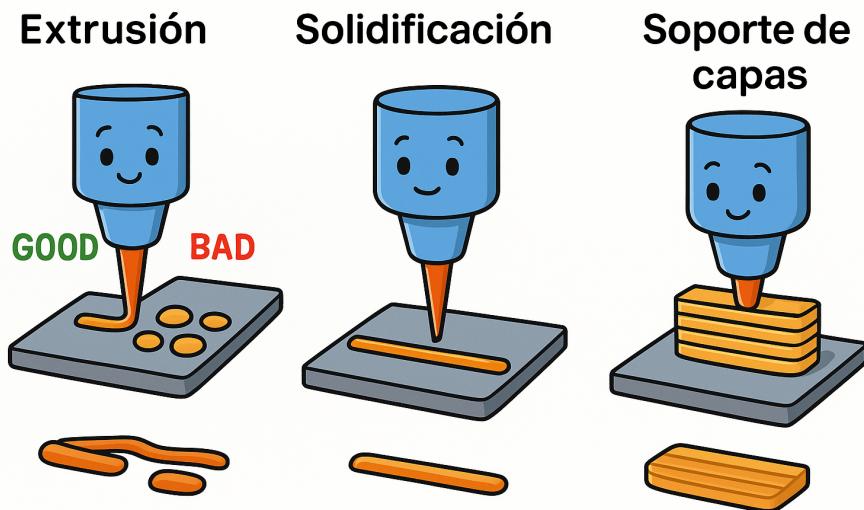


Figura 2.1: Representación esquemática de las tres subfunciones críticas del proceso de escritura directa con tinta (DIW). La extrusión requiere un flujo continuo y uniforme del material (izquierda), la solidificación inmediata posterior evita la deformación por escurrimiento (centro), y el soporte de capas demanda suficiente resistencia estructural del material depositado (derecha). Estas condiciones están determinadas por el comportamiento reológico del material, como la pseudoplásticidad, el módulo de almacenamiento y la recuperación estructural. Esquema de autoría propia-generado con asistencia de la inteligencia artificial Chat-GPT.

A continuación se tratarán cada una de estas subfunciones en detalle y los parámetros cuali-cuantitativos útiles para su tratamiento.

### 2.2.1. Extrudabilidad y continuidad de flujo

La extrudabilidad se define como la capacidad del material para fluir a través de una boquilla (nozzle) o aguja (needle) sin obstrucciones, con mínima ruptura del filamento y sin deformaciones transversales significativas [61].

Como etapa preliminar en la evaluación de bioinks, esta tesis propone un método de cribado simple: la dispensación manual mediante jeringas de 3 a 5mL cargadas con el material de interés, aplicadas directamente sobre una superficie plana (como una placa Petri). Esta estrategia, de bajo costo y rápida ejecución, ya ha sido sugerida por Paxton et

al. (2017) como paso inicial para verificar de forma práctica el comportamiento del bioink durante la extrusión [62]. Si bien otras aproximaciones emplean directamente bioimpresoras para evaluar la extrudabilidad en condiciones controladas [19], incluso en dichos sistemas automatizados, el primer criterio sigue siendo la observación visual de la formación del filamento, lo cual puede reproducirse cualitativamente mediante esta dispensación manual, antes de avanzar a caracterizaciones reológicas o pruebas de implementación directa compleja.

### **2.2.2. Retención de forma y gelificación post-impresión**

Después de la extrusión, el bioink debe recuperar rápidamente su estructura semisólida para mantener la forma impresa sin disgregarse. Este fenómeno está estrechamente relacionado con la capacidad del material de solidificarse tras cesar el esfuerzo cortante, evitando el escorrimiento lateral. Como es conocido en la extrusión de polímeros, una mayor presión durante la dispensación incrementa la cantidad de material depositado, mientras que una mayor velocidad de impresión puede inducir un efecto de estiramiento que impide la relajación de las cadenas poliméricas, dificultando su aglomeración o entrecruzamiento inmediato, lo que compromete la estabilidad del filamento [63].

Los parámetros operativos críticos que definen esta fase son principalmente la presión de extrusión y la velocidad de desplazamiento. No obstante, otro factor igualmente relevante es la altura de capa, entendida como la distancia entre la boquilla y la superficie de impresión. Si esta distancia es demasiado reducida, puede obstruirse el canal e impedir la salida del material; por el contrario, si es demasiado elevada, el filamento puede depositarse de forma incontrolada, generando deformaciones o trayectorias no deseadas [64].

La forma más práctica de controlar estos parámetros es mediante el G-code, el lenguaje que interpretan los equipos de control numérico. Generalmente, se parte de un archivo CAD que, a través de un software slicer, es convertido automáticamente en G-code. Sin embargo, la escritura directa de este código ofrece una ventaja considerable: permite un

control preciso sobre la cantidad de material depositado, la velocidad de desplazamiento del cabezal, la presión de extrusión e incluso la variación de la altura de capa [65].

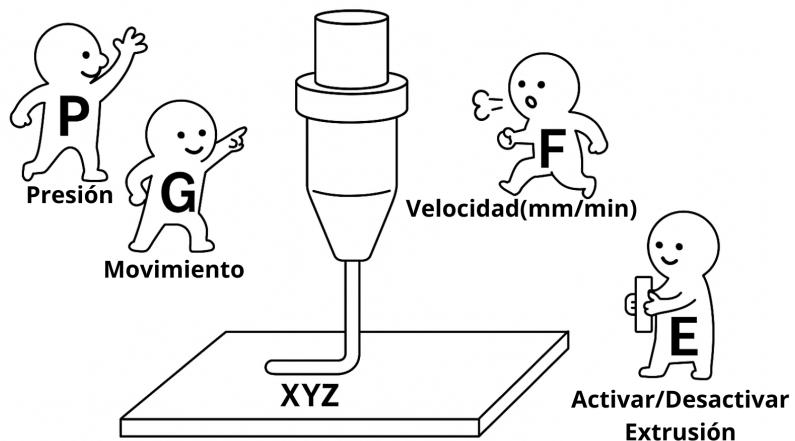


Figura 2.2: Representación conceptual de los principales comandos G-code utilizados en bioimpresión 3D por extrusión. Cada letra indica una instrucción clave: **G** para movimiento (G1 con extrusión), **XYZ** para coordenadas espaciales, **F** para velocidad de impresión (mm/min), **P** para presión de extrusión (en bioprinters que lo permiten), y **E** para activar o desactivar la extrusión del bioink.

Una forma práctica y cuantitativa de evaluar la resolución de impresión —entendida como el grado de fidelidad entre el modelo diseñado por computadora y el objeto impreso— es mediante la medición del grosor de la hebra extruida. En esta tesis, se considerará como mayor resolución aquella en la que la hebra sea más delgada, siempre que esta mantenga su continuidad sin cortarse ni deformarse significativamente [62].

Cabe destacar el trabajo de Dageon Oh et al., quienes aplicaron redes neuronales para optimizar automáticamente los parámetros de impresión a partir de datos reológicos. Aunque este enfoque excede el alcance de la presente investigación, su metodología de medición de hebras ya se encuentra bastante estandarizada. Por tanto, los datos generados en este estudio podrían ser aprovechados en el futuro para implementar modelos similares de optimización [66].

### **2.2.3. Evaluación combinada de fidelidad de fusión y circularidad**

Diversos estudios han establecido métricas confiables para evaluar la calidad de impresión en bioimpresión tridimensional por extrusión. Por un lado, Nguyen et al. (2024) propusieron el *filament fusion test*, una prueba que consiste en imprimir una malla con distancias variables entre filamentos y medir el grado de fusión de los poros resultantes, en función del % de reducción del área teórica respecto al modelo diseñado [67]. Por otro lado, Ouyang et al. (2016) propusieron una forma semicuantitativa de evaluar la circularidad de los poros mediante la expresión  $Pr = 4\pi A/L^2$ , donde  $A$  es el área y  $L$  el perímetro del poro impreso. Valores cercanos a 1 indican estructuras cuadradas bien definidas, mientras que valores cercanos a  $\pi/4$  reflejan fusión o deformación circular del poro [22].

En esta tesis se propone una metodología que integra ambos enfoques de forma simultánea. Para ello, se diseña una malla diagonal de poros con diferentes dimensiones ( $1 \times 1$  a  $5 \times 5$  mm $^2$ ), distribuidos en un solo modelo de prueba (ver Figura 2.3). Esta configuración permite evaluar la capacidad del bioink para mantener filamentos separados, observar el colapso progresivo en poros de menor tamaño, y medir la circularidad de los poros impresos en diferentes condiciones estructurales, facilitando una lectura cruzada con el grado de gelificación.

Este enfoque se ejecuta bajo condiciones controladas de presión, velocidad de impresión y altura de capa, previamente calibradas según las pruebas de extrusión discutidas. La ventaja de concentrar la evaluación en una sola imagen de microscopía o fotografía es doble: permite reducir el tiempo de análisis y estandarizar la selección de bioinks viables. En conjunto, esta estrategia contribuye a establecer criterios objetivos de calidad estructural desde la etapa de prevalidación de formulaciones.

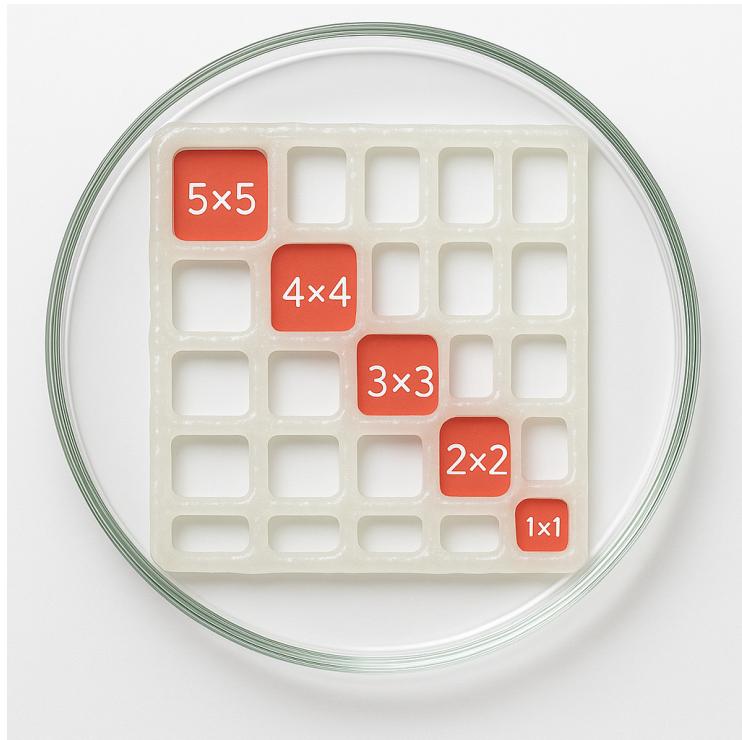


Figura 2.3: Modelo propuesto para la evaluación combinada de fusión y circularidad. La malla diagonal incluye poros con diferentes separaciones entre filamentos (1 a 5 mm), permitiendo analizar el comportamiento estructural del bioink bajo condiciones estandarizadas de impresión. Adaptado de [67].

#### 2.2.4. Estabilidad estructural frente a cargas gravitacionales

En bioimpresión por extrusión, la estabilidad del constructo recién depositado depende críticamente de su resistencia frente a la deformación inducida por la gravedad. Este comportamiento, vinculado al \*creep inicial\* del bioink, es especialmente notable en formulaciones con baja viscosidad o sin reticulación inmediata, donde la hebra sufre colapsos parciales que comprometen la geometría del modelo [25].

Una forma estandarizada de cuantificar esta pérdida estructural es el *filament collapse test*, que consiste en imprimir hebras sobre pilares espaciados y evaluar el colapso en función del *Collapse Factor* ( $C_f$ ), definido como  $C_f = \left(1 - \frac{A_r}{A_t}\right) \times 100\%$ , donde  $A_r$  es el área real del poro colapsado y  $A_t$  el área teórica diseñada [68]. Valores más altos de  $C_f$  reflejan mayor deformación estructural.

Este índice permite comparar formulaciones de forma rápida y reproducible, incluso en etapas tempranas de desarrollo, facilitando la selección de bioinks con adecuada resistencia inicial sin necesidad de ensayos mecánicos extensos.

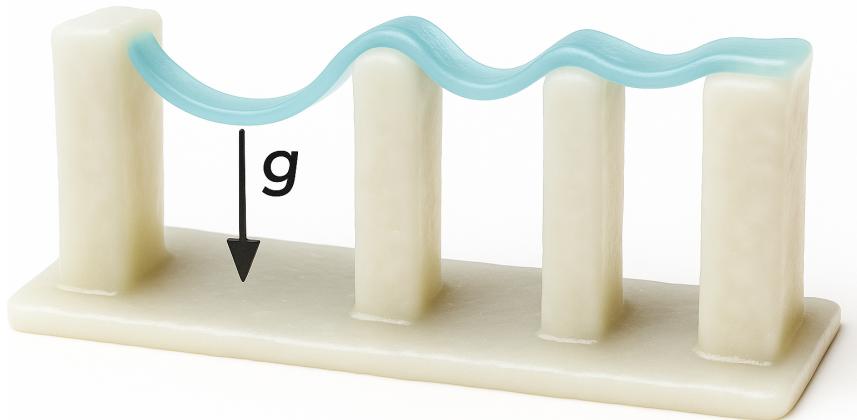


Figura 2.4: Representación tridimensional del *filament collapse test*. Una hebra de hidrogel es depositada sobre columnas espaciadas a distintas distancias. Bajo la acción de la gravedad ( $g$ ), se produce una deformación progresiva que permite cuantificar la resistencia estructural del bioink.

### 2.3. Justificación del uso de la plataforma CELLINK BIO-X en la caracterización funcional de bioinks

El desarrollo experimental de esta tesis se llevó a cabo utilizando la plataforma de bioimpresión tridimensional CELLINK BIO-X, una de las más versátiles y ampliamente adoptadas en el ámbito académico para estudios en ingeniería de tejidos. Su elección no responde únicamente a una disponibilidad local, sino a una evaluación crítica de sus capacidades técnicas, las cuales se alinean estrechamente con los requerimientos metodológicos de este trabajo.

En primer lugar, la BIO-X permite el uso de cabezales intercambiables que operan mediante extrusión neumática, mecánica o térmica, lo que facilita la impresión de una amplia gama de formulaciones hidrogelificadas, incluyendo aquellas compuestas por

alginato, colágeno, gelatina, quitosano y goma xantana. Esta flexibilidad resulta crucial para el objetivo central de esta tesis: evaluar combinaciones estructurales de bioinks con propiedades reológicas contrastantes bajo condiciones operativas controladas.

Además, la plataforma ofrece un control preciso sobre parámetros críticos como presión de extrusión, velocidad de impresión, altura de capa y temperatura del cabezal y la cama, lo que permite implementar con exactitud los protocolos de validación de extrudabilidad, fidelidad geométrica y resistencia estructural discutidos en secciones previas. El control de temperatura (rango de 4–250°C para el cabezal y 4–65°C para la base) es particularmente relevante en formulaciones termorresponsivas como las basadas en gelatina o colágeno.

Otro aspecto fundamental es su cámara cerrada con filtros HEPA y sistema de esterilización por luz UV, que garantiza condiciones estériles durante la impresión y minimiza el riesgo de contaminación biológica. Esta característica es esencial para futuras etapas de validación biológica y cultivo celular, aunque en esta tesis se ha empleado solo para ensayos estructurales.

La validez científica de esta plataforma ha sido ampliamente corroborada en la literatura. Por ejemplo, Xu et al. (2023) utilizaron la BIO-X para imprimir parches dérmicos con hidrogeles GelMA/SilMA, demostrando alta resolución y precisión dimensional [69]. Asimismo, Matthiessen et al. (2023) lograron construir modelos neuronales con astrocitos empleando bioinks basados en ácido hialurónico, evidenciando que esta plataforma permite obtener geometrías complejas sin comprometer la viabilidad celular [70]. Estas experiencias refuerzan su aplicabilidad para fines de evaluación estructural de bioinks, incluso en etapas tempranas de formulación.

En conjunto, estas características convierten a la CELLINK BIO-X en una herramienta ideal para el enfoque propuesto en esta tesis.

## 2.4. El modelo en V en la metodología VDI 2206

El enfoque en “V” es una metodología estructurada para el diseño y validación de sistemas mecatrónicos complejos, como los implicados en la bioimpresión. Este modelo se basa en una relación directa entre etapas de diseño y sus correspondientes fases de verificación y validación, organizadas en forma de V invertida. En el lado izquierdo, se definen los requisitos del sistema, que se descomponen en funciones del subsistema y luego de sus componentes individuales. Estas se traducen en una arquitectura de solución que especifica cómo se integrarán los componentes, y culminan en la implementación física. En el ascenso por el lado derecho, cada nivel es verificado o validado: los componentes se prueban funcionalmente, los subsistemas se integran, evalúan y finalmente, el sistema completo se valida contra los requerimientos iniciales. Este enfoque asegura trazabilidad bidireccional. En el contexto de esta tesis, se adapta el modelo en V para estructurar el diseño racional de biotintas donde los biopolímeros y sus combinaciones representan componentes funcionales cuya selección, caracterización e implementación se vinculan a requisitos específicos de impresión [11, 12, 71].

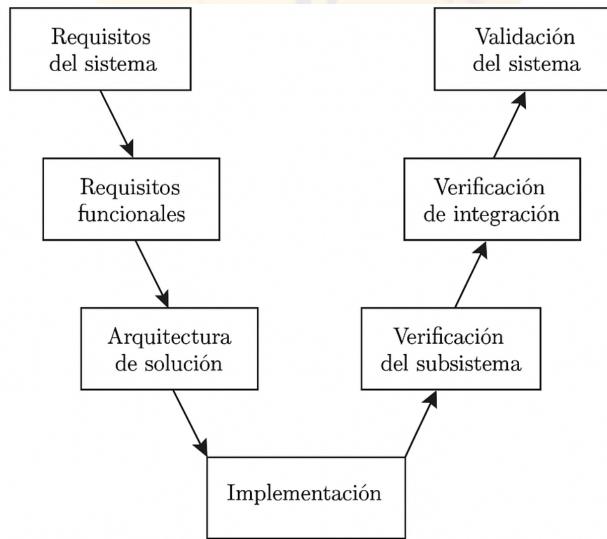


Figura 2.5: Modelo en V adaptado al diseño de sistemas de bioimpresión. Este enfoque metodológico permite vincular de forma estructurada las etapas de diseño funcional de las formulaciones (lado izquierdo) con las fases de validación experimental y verificación (lado derecho).

## CAPÍTULO 3

### Diseño de un toolbox funcional de hidrogeles híbridos para bioimpresión por extrusión

#### 3.1. Introducción

Se da inicio al desarrollo del primer objetivo específico, conforme a lo establecido en la introducción del trabajo. Cada biomaterial a utilizar en este presente trabajo tiene su propia identidad y con ello propiedades y características particulares, algunas son mencionadas en la Tabla 2.1. En este capítulo describimos como se aprovecha la relación, estructura-propiedad y función dentro de la metodología VDI 2206 tratada en el marco teórico.

#### 3.2. Metodología

En todo curso de anatomía se enfatiza la estrecha relación entre la estructura de los tejidos y órganos y sus respectivas funciones. Este mismo principio se aplica en la ciencia e ingeniería de materiales, donde las propiedades estructurales condicionan el desempeño funcional. En esta tesis se propone el uso de la metodología VDI 2206 como marco para abordar el diseño sistemático de bioinks, permitiendo partir de las características fisicoquímicas de los materiales comúnmente empleados en ingeniería de tejidos para establecer los requisitos funcionales del sistema a desarrollar. A partir de estos requisitos, la metodología permite descomponer el problema en subfunciones, plantear arquitecturas de solución y ejecutar una implementación orientada a la

verificación y validación, asegurando una trazabilidad directa con las propiedades estructurales inicialmente analizadas.

### **3.2.1. Identificación de requisitos funcionales y estructurales del sistema**

Se procedió a identificar y sistematizar las propiedades esenciales que un bioink debe presentar para ser considerado funcionalmente apto en aplicaciones de bioimpresión tridimensional por extrusión. Esta fase, correspondiente al nivel de análisis de requisitos funcionales del sistema, permite sentar las bases del diseño posterior mediante criterios objetivos y replicables.

La recolección de requisitos se basó en una revisión rigurosa de literatura científica realizada y en la consulta de normativas técnicas anteriores, en particular la norma ASTM F3659-24, que establece directrices específicas para la evaluación en contextos biomédicos alizó en formulaciones basadas en hidrogeles naturales de amplio uso, tales como alginato, gelatina, goma xantana, quitosano y colágeno [29].

A partir de esta revisión, se definieron dos grandes categorías de propiedades clave: por un lado, las propiedades fisicoquímicas, que incluyen viscosidad, comportamiento pseudoplástico, capacidad de gelificación rápida, tipo de entrecruzamiento (iónico o covalente), y estabilidad térmica; por otro lado, las propiedades biofuncionales, como biocompatibilidad, adhesión y proliferación celular, actividad antibacteriana, degradación controlada, y soporte para la viabilidad celular post-impresión.

Estos requisitos fueron posteriormente traducidos en criterios de selección y evaluación para el diseño de combinaciones poliméricas, sirviendo como referencia para las siguientes etapas del modelo VDI.

### **3.2.2. Descomposición funcional del sistema**

La segunda etapa metodológica consistió en la descomposición funcional del sistema de bioinks en subfunciones específicas, alineadas con los requisitos definidos previamente. Esta estructuración modular, coherente con la arquitectura jerárquica del modelo VDI 2206, facilita el desarrollo y validación de soluciones parciales.

Los requerimientos fisicoquímicos y biofuncionales se organizaron en subfunciones centradas en la interacción biológica, como la compatibilidad celular, la bioactividad (capacidad de promover adhesión y proliferación celular) y la actividad antibacteriana. Estas subfunciones orientan la definición de arquitecturas de solución y criterios de validación, guiando el diseño racional de formulaciones poliméricas. En función de ello, los materiales seleccionados alginato, gelatina, goma xantana, quitosano y colágeno serán clasificados según su aporte funcional.

### **3.2.3. Arquitectura de soluciones y combinaciones poliméricas**

Planteamiento de combinaciones binarias y ternarias de biopolímeros que puedan satisfacer simultáneamente las subfunciones definidas. Evaluación de sinergias reológicas, gelificantes y bioactivas. Siguiendo el enfoque de Rau et al. [10], se priorizaron para esta tesis las tres subfunciones esenciales asociadas al rendimiento estructural del bioink durante la impresión: (i) la extrudabilidad, como la capacidad del material para fluir de manera continua y estable a través de la boquilla sin interrupciones ni defectos; (ii) la retención de forma, que implica la solidificación inmediata tras la deposición para evitar deformaciones por escorrimiento; y (iii) el soporte de capas, es decir, la habilidad del material para resistir el peso de capas sucesivas sin colapsar ni comprometer la geometría del modelo todo ello se simplifica considerando en primera instancia como indispensables los materiales plastificantes o con capacidad de mejorar las propiedades estructurales.

### **3.2.4. Desarrollo del toolbox y planificación de pruebas**

Construcción del toolbox en forma de una matriz que relacione combinaciones específicas con propiedades esperadas y parámetros operativos. Diseño de modelos experimentales para validar cada formulación.

## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Identificación de requisitos y descomposición funcional del sistema**

En concordancia con la metodología VDI 2206, se identificaron y organizaron las propiedades clave que un bioink debe cumplir para su aplicación en bioimpresión por extrusión. La Figura 3.1 resume visualmente estas propiedades, clasificadas en dos bloques principales: propiedades fisicoquímicas, relacionadas con el desempeño del material durante la impresión, y propiedades biofuncionales, asociadas a la interacción biológica post-impresión.

Se destacan subfunciones estratégicas como la optimización del desempeño reológico, entrecruzamiento acelerado, respuesta térmica y pH-dependiente, biomimetismo, actividad antibacteriana y promoción de la adherencia celular. Estas subfunciones fueron vinculadas a los biopolímeros naturales utilizados en esta tesis alginato, gelatina, goma xantana, quitosano y colágeno facilitando así su selección racional en función de los requisitos del sistema.

Cabe señalar que una descripción detallada de cada uno de estos biopolímeros, junto con sus propiedades estructurales, origen y aplicaciones, se desarrolla en el Capítulo 2 del marco teórico.

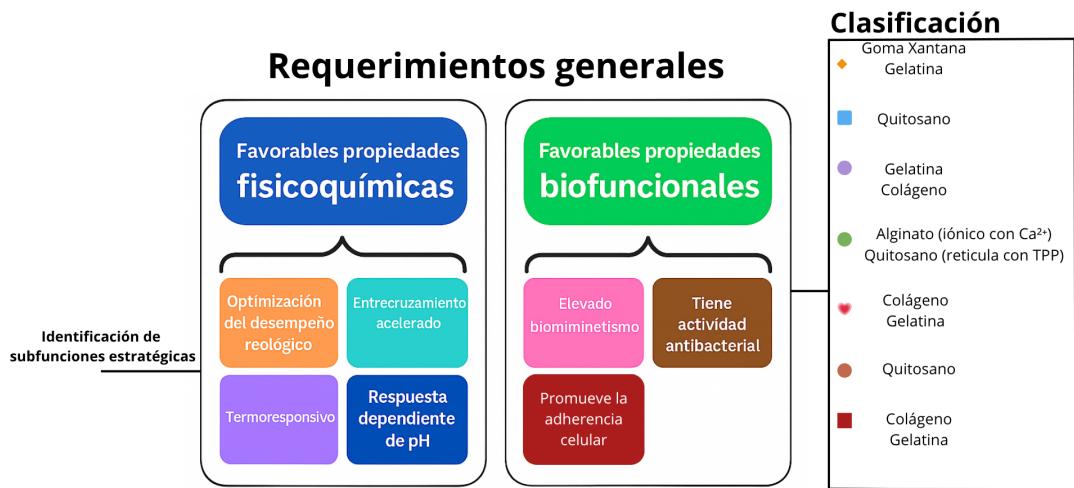


Figura 3.1: Clasificación de subfunciones estratégicas en bioimpresión 3D por extrusión, y su relación con propiedades fisicoquímicas y biofuncionales. Se indica además la correspondencia con materiales base utilizados en esta tesis.

### 3.3.2. Clasificación funcional y generación del biomaterial-toolbox

Como resultado del proceso de clasificación funcional, se establecieron siete combinaciones binarias de biopolímeros con potencial estructural, seleccionadas en función de su capacidad para cubrir simultáneamente subfunciones críticas del bioink, como soporte mecánico, bioactividad y estabilidad durante la impresión.

Las formulaciones identificadas muestran propiedades complementarias: la goma xantana destaca por su efecto estructurante y su capacidad para modular la viscosidad del sistema, mientras que la gelatina y el colágeno aportan dominios bioactivos que favorecen la adhesión celular. Por otro lado, el alginato permite un entrecruzamiento iónico rápido tras la deposición, y el quitosano introduce funcionalidad antibacterial.

En la Tabla 3.1 se resumen las combinaciones seleccionadas, indicando los materiales constituyentes, la función esperada para cada mezcla y el disolvente empleado para su preparación. Todas las combinaciones se diseñaron considerando compatibilidad de

disolución y potencial sinérgico en impresión por extrusión.

Tabla 3.1: Combinaciones binarias de hidrogeles estructurales, función esperada y disolvente recomendado

Código	Material A	Material B	Función esperada	Solvente recomendado
H01	Goma Xantana	Gelatina	Estructural, adherencia celular	Agua
H02	Goma Xantana	Alginato	Estructural, entrecruzamiento rápido	Agua
H03	Goma Xantana	Quitosano	Estructural, antibacterial	Ácido acético
H04	Goma Xantana	Colágeno	Estructural, adherencia celular	Agua
H05	Gelatina	Alginato	Estructural, entrecruzamiento rápido	Agua
H06	Gelatina	Quitosano	Estructural, antibacterial	Ácido acético
H07	Gelatina	Colágeno	Estructural, adherencia celular	Agua

Como extensión al análisis de combinaciones binarias, se plantearon formulaciones ternarias y cuaternarias que integran múltiples funcionalidades en una sola matriz polimérica. Estas combinaciones se diseñaron con el objetivo de maximizar el rendimiento estructural del bioink durante la impresión, al tiempo que se incorporan propiedades biológicas específicas, como la bioadhesión celular y la actividad antibacterial.

Las formulaciones ternarias (códigos T01–T04) incluyen tres biopolímeros complementarios que permiten equilibrar viscosidad, gelificación rápida y funcionalidad biológica. Por su parte, las formulaciones cuaternarias (Q01 y Q02) incorporan un cuarto componente con el fin de potenciar aún más la estabilidad estructural y la versatilidad biofuncional del sistema.

En la Tabla 3.2 se detallan las composiciones seleccionadas, junto con la función esperada para cada combinación y el disolvente empleado en su preparación.

Tabla 3.2: Combinaciones ternarias y cuaternarias de biopolímeros, función esperada y disolvente recomendado

Código	Composición	Función esperada	Solvente recomendado
T01	Goma Xantana + Gelatina + Alginato	Estructural, entrecruzamiento rápido, adherencia celular	Agua
T02	Goma Xantana + Gelatina + Quitosano	Estructural, bioadhesión, antibacterial	Ácido acético
T03	Gelatina + Alginato + Colágeno	Estructural, bioactividad alta, entrecruzamiento rápido	Aqua
T04	Goma Xantana + Alginato + Colágeno	Estructural, entrecruzamiento rápido, bioadhesión	Aqua
Q01	Goma Xantana + Gelatina + Alginato + Colágeno	Estructural, bioactivo, impresión estable	Aqua
Q02	Goma Xantana + Gelatina + Quitosano + Colágeno	Estructural, bioadhesivo, antibacterial	Ácido acético

En total se seleccionaron trece combinaciones probables, integrando siete formulaciones binarias, cuatro ternarias y dos cuaternarias. Estas configuraciones representan una matriz inicial de bioinks con potencial de ser evaluados experimentalmente, cada una diseñada estratégicamente para satisfacer las subfunciones estructurales y biofuncionales definidas en la etapa de descomposición funcional. Su análisis posterior permitirá identificar las formulaciones más prometedoras para aplicaciones específicas en bioimpresión tridimensional por extrusión.

## CAPÍTULO 4

### Evaluación estructural y validación operativa de bioinks en impresión 3D por extrusión

#### Introducción

Tras el diseño racional del toolbox de bioinks híbridos descrito en el capítulo anterior, este capítulo aborda su evaluación estructural y validación funcional mediante ensayos controlados de impresión por extrusión. Siguiendo la lógica metodológica del modelo en V de la directriz VDI 2206, se transita ahora del plano de diseño conceptual a la fase de verificación experimental, estableciendo correspondencias directas entre las propiedades estructurales proyectadas y el desempeño observado en condiciones reales de bioimpresión.

La validación estructural de las formulaciones se lleva a cabo en tres niveles progresivos: primero, mediante pruebas preliminares de extrudabilidad con jeringas manuales, que permiten descartar formulaciones con comportamiento inadecuado de flujo; luego, mediante la parametrización sistemática de presión y velocidad en la plataforma CELLINK BIO-X, cuantificando su impacto sobre la resolución y continuidad del filamento impreso; y finalmente, mediante ensayos de estabilidad geométrica post-extrusión, como el *filament fusion test* y el *collapse test*, que permiten evaluar la fidelidad de forma, la resistencia frente a la gravedad y la capacidad de soporte de capas.

Esta secuencia experimental tiene como finalidad identificar qué combinaciones del toolbox cumplen con las tres subfunciones estructurales clave propuestas por Rau et

al. [10]: extrudabilidad, retención de forma y soporte de capas. La validación cruzada entre parámetros operativos, métricas geométricas y comportamiento del material permitirá priorizar las formulaciones más prometedoras, avanzando desde una etapa exploratoria hacia una selección fundamentada con evidencia cuantificable. Este enfoque contribuye a consolidar un protocolo reproducible y eficiente para el cribado de bioinks en etapas tempranas de desarrollo.

## 4.1. Metodología

### 4.1.0.1. Preparación de las formulaciones para evaluación estructural

Para ejecutar la fase de verificación estructural, se procedió a la preparación de las formulaciones seleccionadas del toolbox diseñado en el capítulo anterior. Cada combinación binaria, ternaria o cuaternaria fue reproducida en concentraciones entre 1 y 8 % p/v.

La preparación se llevó a cabo bajo agitación magnética continua durante un periodo mínimo de ocho horas, empleando placas calefactoras con control de temperatura ajustado según el tipo de polímero base (35–40 °C para formulaciones con gelatina; temperatura ambiente para formulaciones sin requerimientos térmicos). En los casos en los que se utilizó ácido acético como disolvente —particularmente en formulaciones con quitosano—, se preparó una solución acuosa al 1 % v/v como medio de disolución previo a la incorporación de los demás componentes.

Todas las soluciones fueron almacenadas a 4 °C durante un mínimo de 12 horas posteriores a su preparación para permitir la estabilización de las interacciones moleculares y garantizar condiciones reproducibles durante su posterior evaluación estructural. Las formulaciones fueron cargadas en condiciones asépticas dentro de jeringas estériles de 5 mL, retirando cuidadosamente las burbujas de aire antes de iniciar los ensayos de extrudabilidad y bioimpresión.

#### **4.1.1. Verificación de funcionalidad estructural**

En coherencia con la arquitectura metodológica definida en la etapa de diseño conceptual, esta sección corresponde a la fase de verificación del modelo en V adoptado en el presente trabajo. Las pruebas descritas a continuación permiten contrastar las propiedades estructurales proyectadas para cada formulación con su desempeño real bajo condiciones de bioimpresión por extrusión.

La estrategia de verificación se estructuró en dos niveles. Primero, se aplicó un cribado funcional cualitativo, orientado a descartar formulaciones con comportamiento de flujo inadecuado, mediante una prueba de extrudabilidad manual. Posteriormente, se evaluó el comportamiento estructural de los bioinks seleccionados bajo condiciones operativas controladas en la plataforma CELLINK BIO-X, analizando variables geométricas asociadas a la fidelidad de impresión, retención de forma y estabilidad post-extrusión.

Esta transición del plano proyectual al plano experimental permite validar si las combinaciones propuestas satisfacen los criterios mínimos requeridos para su uso en bioimpresión tridimensional por extrusión, asegurando trazabilidad entre requisitos, arquitectura funcional y desempeño observado.

##### **4.1.1.1. Evaluación preliminar de extrudabilidad mediante dispensación manual**

Como paso inicial dentro de la fase de verificación, se implementó una prueba cualitativa de extrudabilidad basada en dispensación manual. Cada bioink fue cargado en jeringas convencionales de 3 a 5 mL y extruido sobre placas Petri estériles mediante boquillas de calibre 27G y 22G. Esta configuración buscó simular condiciones operativas básicas sin intervención automatizada.

Este procedimiento, propuesto por Paxton et al. [62], permite observar directamente aspectos críticos como la continuidad del filamento, la fluidez del material sin obstrucciones y la capacidad del hidrogel para conservar su forma tras la deposición.

Aunque no proporciona métricas cuantitativas, su valor metodológico radica en su utilidad como filtro práctico para descartar formulaciones no viables en etapas tempranas de desarrollo [61, 19].

Solo las formulaciones que mostraron un desempeño funcional adecuado fueron seleccionadas para la siguiente fase de verificación estructural en condiciones controladas, conforme al flujo de validación progresiva definido en la metodología general.



Figura 4.1: Prueba de extrudabilidad manual como cribado funcional inicial. Se muestra la dispensación de una biotinta azul sobre una placa Petri mediante jeringa con aguja 22G. La línea inferior conserva continuidad y forma, siendo clasificada como "aprobó", mientras que la línea superior presenta pérdida de definición y extensión irregular, siendo marcada como "Falló". Al fondo se observan múltiples formulaciones cargadas en jeringas estériles, representando la diversidad de composiciones evaluadas.

#### 4.1.1.2. Parametrización de presión y velocidad de impresión en la plataforma BIO-X

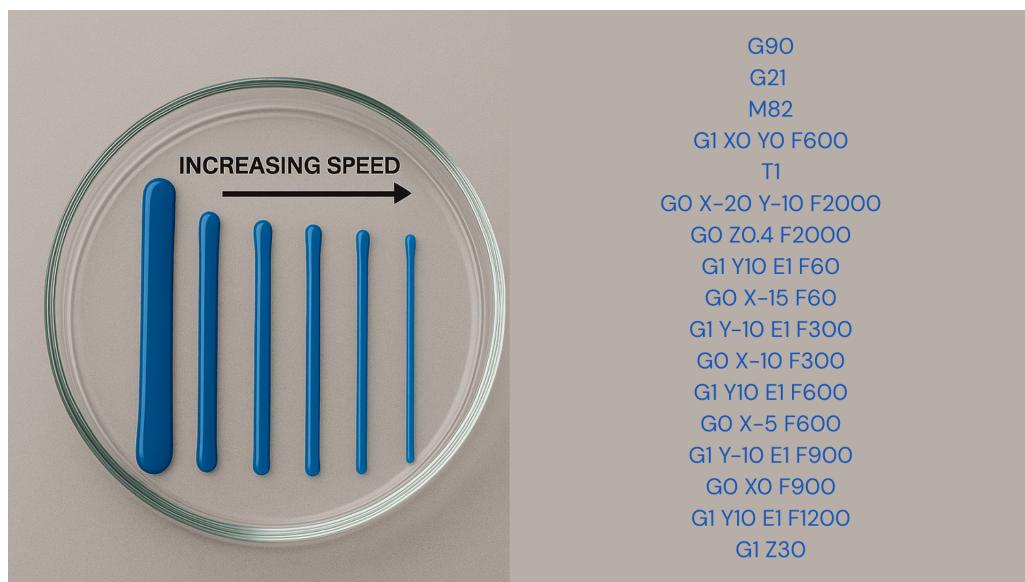
Para establecer las condiciones óptimas de impresión para cada bioink seleccionado, se implementó una etapa de parametrización sistemática en la plataforma CELLINK BIO-X. Esta fase tuvo como objetivo definir una ventana operativa robusta que

permitiera obtener trazos continuos, uniformes y reproducibles, manteniéndose dentro del régimen viscoelástico lineal de cada formulación.

Se empleó un G-code personalizado que permitía controlar de forma directa la presión neumática y la velocidad de impresión, evitando la dependencia del software de corte convencional y garantizando condiciones mecánicas constantes durante la extrusión [20, 21]. La presión fue ajustada dentro de un rango de 0.1 a 120 psi, según el comportamiento reológico específico de cada hidrogel, mientras que las velocidades evaluadas fueron de 1, 5, 10, 15 y 20 mm/min. En todos los casos se mantuvo un z-step constante de 0.2 mm.

Los filamentos extruidos fueron capturados fotográficamente bajo condiciones ópticas estandarizadas y analizados en ImageJ. Se realizaron mediciones triplicadas del ancho de filamento por configuración y se procesaron mediante scripts en Python, permitiendo cuantificar la influencia de cada parámetro sobre la uniformidad del trazo, la estabilidad de extrusión y la fidelidad morfológica de la impresión.

Este procedimiento permitió identificar combinaciones de presión y velocidad adecuadas para cada bioink, asegurando condiciones de impresión compatibles con su uso posterior en pruebas estructurales más complejas.



**Figura 4.2: Evaluación de extrusión a diferentes velocidades de impresión.** Visualización del comportamiento de una biotinta extruida sobre una placa Petri bajo diferentes velocidades programadas mediante G-code personalizado. Se observa una disminución progresiva en el grosor del filamento a medida que aumenta la velocidad de impresión, siguiendo el código mostrado al lado derecho de la imagen. Esta prueba permite establecer una ventana operativa óptima de extrusión para cada formulación evaluada.

#### 4.1.2. Validación del desempeño general

Las formulaciones que superaron las pruebas estructurales fueron sometidas a una evaluación cruzada entre las métricas experimentales obtenidas y los requisitos funcionales definidos en la etapa de descomposición del sistema. Este análisis permitió determinar el grado de concordancia entre el comportamiento observado y los criterios de extrudabilidad, retención de forma y soporte de capas. A partir de esta evaluación, se jerarquizaron las combinaciones del toolbox en función de su desempeño global, identificando aquellas con mayor potencial para aplicaciones futuras en bioimpresión tridimensional de tejidos blandos.

#### **4.1.3. Trazabilidad y transferencia de conocimiento**

Cada etapa del proceso fue documentada de forma detallada para asegurar su trazabilidad técnica y permitir su replicación por otros investigadores. Se sistematizó la información en fichas técnicas por formulación, incluyendo composiciones, parámetros operativos, resultados estructurales y observaciones relevantes. Finalmente, se discutieron las posibilidades de adaptar esta metodología a distintos contextos de diseño de bioinks, así como su escalabilidad hacia procesos de validación biológica o integración en sistemas preclínicos, contribuyendo al desarrollo de protocolos estandarizados en biofabricación.

#### **4.2. Resultados**

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. M. D. Silva, P. T. Benites, M. E. G. Zulin, M. A. Ferreira Júnior, A. I. Q. Cardoso, and E. R. J. Cury. Global legislation regulating the donation, procurement and distribution processes of organs and tissues from deceased donors for transplants: A scoping review. *Heliyon*, 10(4):e26313, Feb 2024. Erratum in: *Heliyon*. 2024 May 22;10(17):e31739. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e31739.
- [2] Carlos Enrique Neciosup Salcedo. La donación de órganos y tejidos en el perú. Technical report, Ministerio de Salud del Perú, Lima, Perú, 2018. Presentación técnica ante la Comisión de Salud y Población del Congreso de la República del Perú, 11 de septiembre de 2018.
- [3] Sergio C. Pedroza-González, Mario Rodriguez-Salvador, Benjamín E. Pérez-Benítez, Mariano M. Alvarez, and Guillermo T. Santiago. Bioinks for 3d bioprinting: A scientometric analysis of two decades of progress. *International Journal of Bioprinting*, 7(2):333, April 2021.
- [4] Cathal D. O'Connell, Paul D. Dalton, and Dietmar W. Hutmacher. Why bioprinting in regenerative medicine should adopt a rational technology readiness assessment. *Trends in Biotechnology*, 42(10):1218–1229, 2024.
- [5] Vundrala Sumedha Reddy, Brindha Ramasubramanian, Vedant Mohan Telrandhe, and Seeram Ramakrishna. Contemporary standpoint and future of 3d bioprinting in tissue/organs printing. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 27:100461, 2023.
- [6] Jose Caceres-Alban, Midori Sanchez, and Fanny L. Casado. Bioprinting: A strategy to build informative models of exposure and disease. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 16:594–610, 2023.

- [7] Joshua Copus, Sang Jin Lee, and Anthony Atala. Chapter 6 - bioink printability methodologies for cell-based extrusion bioprinting. In Lijie Grace Zhang, John P. Fisher, and Kam W. Leong, editors, *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (Second Edition)*, pages 153–183. Academic Press, second edition edition, 2022.
- [8] Sean V Murphy and Anthony Atala. 3d bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8):773–785, 2014.
- [9] Daniel A. Rau, Christopher B. Williams, and Michael J. Bortner. Rheology and printability: A survey of critical relationships for direct ink write materials design. *Progress in Materials Science*, 140:101188, 2023.
- [10] Daniel A. Rau, Michael J. Bortner, and Christopher B. Williams. A rheology roadmap for evaluating the printability of material extrusion inks. *Additive Manufacturing*, 75:103745, 2023.
- [11] Verein Deutscher Ingenieure (VDI). VDI 2206: Design methodology for mechatronic systems. VDI-Richtlinien, VDI-Handbuch Konstruktion, 2004. VDI-Gesellschaft Entwicklung Konstruktion Vertrieb (VDI-EKV).
- [12] Verein Deutscher Ingenieure (VDI). VDI 2206:2021-11 – Entwicklung mechatronischer und cyber-physischer Systeme. VDI-Richtlinie, Beuth Verlag, November 2021. DOI: 10.31030/3366155.
- [13] Roya Abka-Khajouei, Latifa Tounsi, Nasim Shahabi, Anil Kumar Patel, Slim Abdelkafi, and Philippe Michaud. Structures, properties and applications of alginates. *Marine Drugs*, 20(6), 2022.
- [14] Surendrasingh Y. Sonaye, Elif G. Ertugral, Chandrasekhar R. Kothapalli, and Prabaha Sikder. Extrusion 3d (bio)printing of alginate-gelatin-based composite scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Materials*, 15(22), 2022.
- [15] Jay Patel, Biplab Maji, Natesan S. H. N. Moorthy, and Souvik Maiti. Xanthan gum derivatives: review of synthesis, properties and diverse applications. *RSC Advances*, 10(45):27103–27136, 2020.

- [16] R. C. Navarrete, R. E. Himes, and J. M. Seheult. Applications of xanthan gum in fluid-loss control and related formation damage. In *SPE Permian Basin Oil and Gas Recovery Conference*, pages SPE-59535-MS. Society of Petroleum Engineers, March 2000.
- [17] Shahid Ud Din Wani, Mohammad Ali, Seema Mehdi, Mubashir Hussain Masoodi, Mohammed Iqbal Zargar, and Faiyaz Shakeel. A review on chitosan and alginate-based microcapsules: Mechanism and applications in drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 248:125875, 2023.
- [18] Sina Tajik, Carmen N. Garcia, Sean Gillooley, et al. 3d printing of hybrid-hydrogel materials for tissue engineering: a critical review. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 9(1):29–41, 2023.
- [19] Cathal O’Connell, Junxiang Ren, Leon Pope, Yifan Zhang, Anushree Mohandas, Romane Blanchard, Serena Duchi, and Carmine Onofrillo. *Characterizing Bioinks for Extrusion Bioprinting: Printability and Rheology*, pages 111–133. Springer US, New York, NY, 2020.
- [20] Andrew Gleadall. Fullcontrol gcode designer: Open-source software for unconstrained design in additive manufacturing. *Additive Manufacturing*, 46:102109, 2021.
- [21] Eduardo Henrique Backes, Laura Nicoleti Zamproni, Lina Maria Delgado-Garcia, Leonardo Alves Pinto, Robertha Mariana Rodrigues Lemes, Cynthia Silva Bartolomeo, and Marimélia Aparecida Porcionatto. Protocol for designing and bioprinting multi-layered constructs to reconstruct an endothelial-epithelial 3d model. *STAR Protocols*, 4(3):102467, 2023.
- [22] Liliang Ouyang, Rui Yao, Yu Zhao, and Wei Sun. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3d bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, 8(3):035020, sep 2016.
- [23] Gregory Gillispie, Peter Prim, Joshua Copus, John Fisher, Antonios G Mikos, James J Yoo, Anthony Atala, and Sang Jin Lee. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, 12(2):022003, feb 2020.

- [24] A. Habib, V. Sathish, S. Mallik, and B. Khoda. 3d printability of alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. *Materials (Basel)*, 11(3):454, 2018.
- [25] Duarte Nuno Carvalho, Sophie Dani, Carmen G Sotelo, Ricardo I Pérez-Martín, Rui L Reis, Tiago H Silva, and Michael Gelinsky. Assessing non-synthetic crosslinkers in biomaterial inks based on polymers of marine origin to increase the shape fidelity in 3d extrusion printing. *Biomedical Materials*, 18(5):055017, 2023.
- [26] HNDKA. Human ear model [3d printable file from cults3d]. Digital repository, 2023. Available from: <https://cults3d.com/en/3d-model/art/human-ear-model>.
- [27] International Organization for Standardization. ISO 15190:2003 medical laboratories – requirements for safety, 2003. Accessed: 2025-06-10.
- [28] International Organization for Standardization. ISO 13485:2003 medical devices – quality management systems – requirements for regulatory purposes, 2003. Accessed: 2025-06-10.
- [29] ASTM International. Standard guide for bioinks used in bioprinting, 2024. Approved March 15, 2024. Published April 2024. Under the jurisdiction of ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices. Accessed: 2025-06-10.
- [30] ASTM International. ASTM E3051-16 standard guide for handling of biomedical waste in health care and biomedical research facilities, 2016. Accessed: 2025-06-10.
- [31] Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (bmlb) – 6th edition, 2020. Accessed: 2025-06-10.
- [32] World Health Organization. Safe management of wastes from health-care activities, 2017. Accessed: 2025-06-10.
- [33] Occupational Safety and Health Administration. Laboratory safety guidance, 2011. Accessed: 2025-06-10.
- [34] International Organization for Standardization. ISO 35001:2019 biorisk management for laboratories and other related organisations, 2019. Accessed: 2025-06-10.

- [35] Prema D'Cunha, Benudhar Pande, Muralidhar S. Kathalagiri, Ashok Kumar Moharana, Deepak T. S., and Cismitha Sharol Pinto. Absorbable sutures: chronicles and applications. *International Surgery Journal*, 9(7):1383–1394, Jun. 2022.
- [36] James E. Mark, editor. *Physical Properties of Polymers Handbook*. Springer, New York, 2nd edition, 2007.
- [37] M.F. Maitz. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology*, 1(3):161–176, 2015. SPECIAL ISSUE ON FUNCTIONAL SURFACES OF BIOMATERIALS.
- [38] Otto Wichterle and Drahoslav Lím. Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185(4706):117–118, 1960.
- [39] Allan S. Hoffman. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64:18–23, 2012. MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL.
- [40] Jeffrey Hrkach and Robert Langer. From micro to nano: evolution and impact of drug delivery in treating disease. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(3):567–570, June 2020.
- [41] William C. Jr Wilson and Thomas Boland. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 272(2):491–496, June 2003.
- [42] Vladimir Mironov, Richard P. Visconti, Vladimir Kasyanov, Gabor Forgacs, Christopher J. Drake, and Roger R. Markwald. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 30(12):2164–2174, 2009.
- [43] Hak-Joon Kang, Sang Jin Lee, In Kap Ko, Christopher Kengla, James J. Yoo, and Anthony Atala. A 3d bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, 34(3):312–319, 2016.
- [44] David B. Kolesky, Ryan L. Truby, A. Sydney Gladman, Travis A. Busbee, Kimberly A. Homan, and Jennifer A. Lewis. 3d bioprinting of vascularized,

- heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Advanced Materials*, 26(19):3124–3130, 2014.
- [45] Debapriya Choudhury, Sharav Anand, and May Win Naing. The arrival of commercial bioprinters – towards 3d bioprinting revolution! *International Journal of Bioprinting*, 4(2):139, 2018.
- [46] Eneko Axpe and Michelle L. Oyen. Applications of alginate-based bioinks in 3d bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12):1976, November 2016.
- [47] Giuseppe Tronci, Amanda Doyle, Stephen J. Russell, and David J. Wood. Triple-helical collagen hydrogels via covalent aromatic functionalisation with 1,3-phenylenediacetic acid. *J. Mater. Chem. B*, 1:5478–5488, 2013.
- [48] Rui-Lin Pan, Katarzyna Martyniak, Mahsa Karimzadeh, Daniel G. Gelikman, James DeVries, Kayla Sutter, Melanie Coathup, Mehdi Razavi, Rachel Sawh-Martinez, and Thomas J. Kean. Systematic review on the application of 3d-bioprinting technology in orthoregeneration: current achievements and open challenges. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 9(1):95, 2022.
- [49] Florence Croisier and Christine Jérôme. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), April 2013.
- [50] T. B. May, D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. DeVault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, and R. K. Rothmel. Alginate synthesis by *pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(2):191–206, 1991.
- [51] Devara Venkata Krishna and Mamilla Ravi Sankar. Extrusion based bioprinting of alginate based multicomponent hydrogels for tissue regeneration applications: State of the art. *Materials Today Communications*, 35:105696, 2023.
- [52] Shuang Lu, Kai Na, Jiani Wei, Li Zhang, and Xiaohua Guo. Alginate oligosaccharides: The structure-function relationships and the directional preparation for application. *Carbohydrate Polymers*, 284:119225, 2022.

- [53] Adib Bin Rashid, Nazmir-Nur Showva, and Md Enamul Hoque. Gelatin-based scaffolds: An intuitive support structure for regenerative therapy. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 26:100452, 2023.
- [54] Lester C. Geonzon, Yumika Hayano, Hazuku Takagi, Kaede Takatsuno, Yoko Nitta, Koichi Mayumi, and Shingo Matsukawa. Gelation mechanism and network structure of mixed cold-water fish gelatin and pork skin gelatin elaborated at the molecular level. *Food Hydrocolloids*, 168:111535, 2025.
- [55] Cristina Antich, Srikanya Kundu, Shayne Frebert, Ty Voss, Min Jae Song, and Marc Ferrer. Bioprinting spatially guided functional 3d neural circuits with agarose-xanthan gum copolymer hydrogels. *Biomaterials*, 318:123156, 2025.
- [56] Anuj Kumar, Kummara Madhusudana Rao, and Sung Soo Han. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers*, 180:128–144, 2018.
- [57] Simindokht Afra, Ali Samadi, Peyman Asadi, Mina Bordbar, Malika Iloukhani, Abhishek Rai, and Mahsa Aghajanpour. Chitosan crosslinkers and their functionality in 3d bioprinting to produce chitosan-based bioinks. *Inorganic Chemistry Communications*, 168:112842, 2024.
- [58] Zhaomin Yao, Xin Feng, Zheling Wang, Ying Zhan, Xiaodan Wu, Weiming Xie, Zhiguo Wang, and Guoxu Zhang. Techniques and applications in 3d bioprinting with chitosan bio-inks for drug delivery: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 278:134752, 2024.
- [59] Kaveh Roshanbinfar, Austin Donnelly Evans, Sumanta Samanta, Maria Kolesnik-Gray, Maren Fiedler, Vojislav Krstic, Felix B. Engel, and Oommen P. Oommen. Enhancing biofabrication: Shrink-resistant collagen-hyaluronan composite hydrogel for tissue engineering and 3d bioprinting applications. *Biomaterials*, 318:123174, 2025.
- [60] Mohammad Amir Qureshi, Basree, Raqeeba Aziz, Yasser Azim, and Musheer Ahmad. Polymeric hydrogels for bioprinting: A comprehensive review. *Annals of 3D Printed Medicine*, 18:100198, 2025.

- [61] S. Qaidi, A. Yahia, B.A. Tayeh, H. Unis, R. Faraj, and A. Mohammed. 3d printed geopolymers composites: A review. *Materials Today Sustainability*, 20:100240, 2022.
- [62] Nathan Paxton, Willi Smolan, Tobias Böck, Ferry Melchels, Jürgen Groll, and Tomasz Jungst. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, 9(4):044107, 2017.
- [63] Meghan E. Cooke and Daniel H. Rosenzweig. The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. *APL Bioengineering*, 5(1):011502, 2021.
- [64] Sungwoo Jang, Andrew Boddorff, Dong June Jang, Jacob Lloyd, Karla Wagner, Naresh Thadhani, and Blair Brettmann. Effect of material extrusion process parameters on filament geometry and inter-filament voids in as-fabricated high solids loaded polymer composites. *Additive Manufacturing*, 47:102313, 2021.
- [65] José Luis Dávila, Bruna Maria Manzini, Jéssica Heline Lopes da Fonsêca, Ingri Julieth Mancilla Corzo, Paulo Inforçatti Neto, Silmara Aparecida de Lima Montalvão, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, Marcos Akira d'Ávila, and Jorge Vicente Lopes da Silva. A parameterized g-code compiler for scaffolds 3d bioprinting. *Bioprinting*, 27:e00222, 2022.
- [66] Dageon Oh, Masoud Shirzad, Min Chang Kim, Eun-Jae Chung, and Seung Yun Nam. Rheology-informed hierarchical machine learning model for the prediction of printing resolution in extrusion-based bioprinting. *International Journal of Bioprinting*, 9(6):1280, 2023.
- [67] Dung NGUYEN, Nghia Phan, and Ha TRAN. Developing printable and non-toxic gelatin-alginate ink for 3d printing using calcium chloride pre-crosslinking. *Advanced Biomedical Engineering*, 13:293–300, 10 2024.
- [68] Zan Lamberger, Dirk W Schubert, Margitta Buechner, Nathaly Chicaiza Cabezas, Stefan Schrüfer, Nicoletta Murenu, Natascha Schaefer, and Gregor Lang. Advanced optical assessment and modeling of extrusion bioprinting. *Scientific Reports*, 14(1):13972, 2024.

- [69] Lei Xu, Zhiqiang Zhang, Adam M. Jorgensen, Yuan Yang, Qianheng Jin, Guangliang Zhang, Gaobiao Cao, Yi Fu, Weixin Zhao, Jihui Ju, and Ruixing Hou. Bioprinting a skin patch with dual-crosslinked gelatin (gelma) and silk fibroin (silma): An approach to accelerating cutaneous wound healing. *Materials Today Bio*, 18:100550, 2023.
- [70] Isabelle Matthiesen, Michael Jury, Fatemeh Rasti Boroojeni, Saskia L. Ludwig, Muriel Holzreuter, Sebastian Buchmann, Andrea Åman Träger, Robert Selegård, Thomas E. Winkler, Daniel Aili, and Anna Herland and. Astrocyte 3d culture and bioprinting using peptide functionalized hyaluronan hydrogels. *Science and Technology of Advanced Materials*, 24(1):2165871, 2023. PMID: 36733710.
- [71] J. Gausemeier and S. Moehringer. Vdi 2206- a new guideline for the design of mechatronic systems. *IFAC Proceedings Volumes*, 35(2):785–790, 2002. 2nd IFAC Conference on Mechatronic Systems, Berkeley, CA, USA, 9-11 December.