



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

INGENIARITZA ETA ARKITEKTURA

**Soja proteinan oinarritutako
konstrukt biobateragarrien 3D
inprimaketarako tintak**

*Iraia Osquilla, Hegoa Craamer,
Koro de la Caba eta Pedro Guerrero*

27-34 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.03.03>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



BERGARA

Soja proteinan oinarritutako konstruktua biobateragarrien 3D inprimaketarako tintak

Iraia Osquilla, Hegoa Craamer, Koro de la Caba, Pedro Guerrero

BIOMAT taldea, Gipuzkoako Ingeniaritza Eskola, Europa Plaza 1, 20018 Donostia
iraia.osquilla@ehu.eus

Laburpena

Ikerketa honetan, 3D inprimaketarako tinta biobateragarriak garatu ziren, ehun-ingeniarietako eta medikuntza birsortzaileko aplikazioetarako. Formulazioak proteinetan eta disolbatzaile eutektiko sakon batean (DES ingelesezko sigletan) oinarritzen dira. Disolbatzaile honek zelulosa-disolbatzaile gisa jarduten du eta, gainera, eroankortasun ionikoa ematen dio tintari. 3D inprimaketaren bidez lortutako konstruktua erreologiari, portaera mekanikoari eta biobateragarritasunari dagokienez karakterizatu ziren, biomedikuntzako arloan inplementatzeko propietate mekaniko eta biologiko egokiak erakutsiz, eta etorkizunean aplikazio klinikoetarako egokitasun handia agertuz.

Hitz gakoak: Tinta biobateragarriak, 3D inprimaketa, konstruktua, biomedikuntza arloa.

Abstract

In this study, biocompatible 3D printing inks were developed for applications in tissue engineering and regenerative medicine. The formulations are based on proteins and a deep eutectic solvent (DES), which acts as a cellulose solvent and also confers ionic conductivity to the ink. The scaffolds obtained by 3D printing were characterised in terms of rheology, mechanical behaviour and biocompatibility, demonstrating mechanical and biological properties suitable for implementation in the biomedical field, showing a high suitability for clinical applications in the future.

Keywords: Biocompatible inks, 3D printing, scaffold, biomedical field.

1. Sarrera eta motibazioa

Fabrikazio gehigarriak edo 3D inprimaketak hainbat sektore eraldatu ditu, egitura konplexuen sorkuntza zehatza eta pertsonalizatua ahalbidetu baitu (Attaran, 2017). Biomedikuntzako arloan, biotintak erabiltzeagatik nabarmentzen da. Biotintak zelula kanpoko matrizea (MEC ingelesezko sigletan) imitatzen duten biomaterialak dira eta zelulen atxikitzea, ugaltzea eta bereiztea errazteaz gain ehun eta egitura zelularren sorrera ahalbidetzen dute (Da Silva et al., 2020).

Biotintek etorkizun handiko aplikazioak aurkezten dituzte medikuntza birsortzailean baita organo eta ehun artifizialen garapenean ere (Da Silva et al., 2020). Horren adibide da zauriak tratatzeko eta artikulazioetako lesioetarako materialak garatzea. Hala ere, gorputzarekin zuzenean kontaktuan egongo diren egiturak inprimatzeko orduan, hala nola inplanteak edo konstruktua, erronka nagusia biobateragarritasunari, toxikotasun ezari, biskoelastikotasunari eta egonkortasun mekanikoari buruzko baldintza espezifikoak betetzen dituzten materialak hautatzea da, zelulen bideragarritasuna eta inprimatutako ehunen funtzionaltasuna bermatuz (Cui et al., 2020).

Hori dela eta, arlo honetako ikerketa inprimatze zehatza ahalbidetzen duten eta zelulen hazkundera eta ehunen birsorkuntza sustatzen dituzten material biobateragarriak eta biodegradagarriak identifikatzera bideratzen da.

Lan honetan landare jatorriko proteinetatik (soja proteina, SPI) eta animali jatorriko proteinetatik (gelatina) ekoiztatutako biotintak garatzen eta karakterizatzen dira. Soja proteina soja-olioaren produkzioa azpiproduktu bat da bere nutrizio-aberastasunagatik erabiltzen dena. Aminoazido esentzialak eta ez-esentzialak ditu. Bere egitura globularrak eta propietate erreologikoak, hala nola gelak eratzeak eta biskositatea aldatzeko gaitasunak, egonkortasuna eta kohesioa ematen diote, 3D inprimaketa egokia ahalbidetuz (Las Heras et al., 2020; Hasan et al., 2024).

Bestetik, gelatina, jatorri naturaleko egiturazko proteina hidrodisolagarria da, biobateragarritasunagatik eta medikuntza birsortzailean duen etorkizun oparoagatik aintzatetsia (Garcia-Orue et al., 2023). Zelulen atxikidura eta hauek konstruktua barruan integratzea errazten duen RGD sekuentzia du (arginina-glizina-aspartikoa). Gainera, gelifikazio termikorako,

biskositatearen doikuntzarako eta egituraren egonkortasunerako duen gaitasunari esker, 3D inprimaketarako biomaterial optimo bilakatu da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aplikazio biomedikoetan erabiltzen diren biotintak bi kategoria nagusitan sailka daitezke: polimero sintetikoak eta biopolimeroak. Material sintetikoak propietate mekaniko onak dituzten polimero artifizialak dira, hala nola azido polilaktikoa (PLA). Material hauek inprimatzeko orduan erraztasuna eskaintzen dute eta egitura egonkor eta erresistenteak ekoizten dituzte. Gainera, biodegradagarriak dira. Hala ere, biobateragarritasun mugatua eta zelula biziekin elkarrekin eskasa izateak desabantaila nabarmenak dakartza medikuntza birsortzailean aplikatzeko (Portan et al., 2021).

Bestalde, biopolimeroak material naturaletatik eratortzen dira edo sistema biologikoekin modu seguruan elkarrengatik diseinatu daude, hala nola gelatina metrilatua (GelMA). Material hau, bere biobateragarritasun onagatik eta zelulak atxikitze, ugaltze eta bereizteko gaitasunagatik nabarmentzen da. Hala eta guztiz ere, GelMAk erresistentzia mekaniko mugatua du. Horrek mugatu egiten du egitura egonkorragoa eskatzen duten konstruktuen fabrikazioan erabiltzea (Leu Alexa et al., 2021).

Muga horiek kontuan hartuta, lan honen helburua landare eta animalia jatorriko proteinetatik eta DES eta zelulosatik abiatutako gelak garatzea da, 3D inprimaketan aplikatzeko, kartilagoa eta meniskoa birsortzeko konstruktuk lortzeko.

Konstruktuk horiek propietate mekaniko optimoak eta biobateragarritasun altua izatea bilatzen da, gaur egun erabilgarri dauden materialen mugak gaindituz. Gainera, eroankortasun ionikoa gehitzea ere bilatzen da, zelulen ugalketa hobetzeko eta ontze-denborak murrizteko, ehun horien birsorkuntza eraginkorrerako oztopo nagusietako bati aurre eginez.

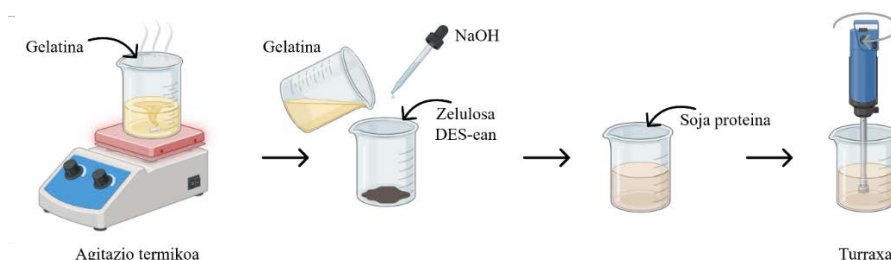
3. Ikerketaren muina

3.1 Tintaren prestakuntza

Bolumenarekiko %25eko pisua duen soja-proteinazko disoluzio bat prestatu zen, eta gelatina gehitu zitzaion sojaren pisuaren %60ko proportzioan. Gainera, sojaren pisuaren %50 adinako DES kantitatea gehitu zitzaion, baita zelulosa ere, azken hau DESaren pisuaren % gisa adierazitako proportzioan.

Gelatina II motako uretan disolbatu zen 80 °C-tan, 30 minutuz etengabeko irabiaketan. Soluzio hau DESari eta zelulosari gehitu zitzaion, pHa 7ra doitu NaOHaren bidez. DESa kolin kloruro, azido zitriko eta uraren 1:1:2 erlazio molarrean prestatu zen, 80 °C-tan 30 minutuz nahastuz. Ondoren, zelulosa gehitu zen %10, 15 edo 20an DESaren pisuarekiko. Nahastea 80 °C-tan mantendu zen 3 orduz irabiatuz. Azkenik, soja gehitu zen eta nahasketa Turrax baten bidez homogeneizatu zen 3 minutuz 8000 rpm-tan.

1. irudia: Tintaren prestakuntza 3D inprimaketarako.

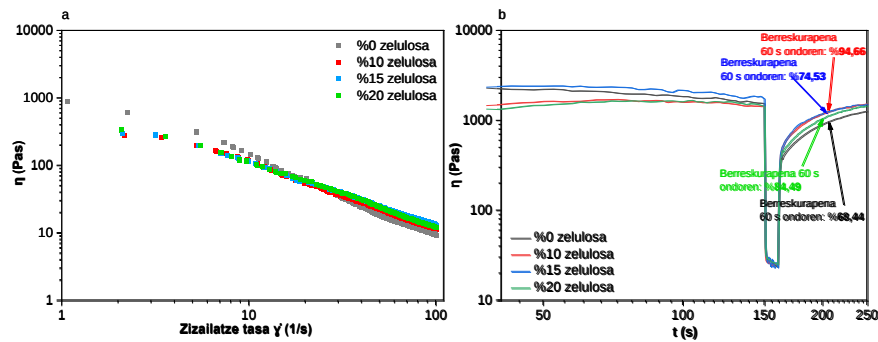


3.2 Erreologia eta 3D inprimaketa

Tintaren biskositatea 10 eta 60 °C bitarteko tenperatura-arrapala baten bidez ebaluatu zen, inprimaketa baldintza optimoak zehazteko. Ebaluazio hori egin eta gero, 30 °C-ko tenperatura 3D inprimaketarako egokiena zela erabaki zen (Etxabide et al., 2019).

Saiakera erreologiko gehigarriak egin ziren, hala nola zizailatze-, maiztasun- eta berreskuratze tasak, propietate biskoelastikoak karakterizatzeko. Zizailatze-kurbek argaltzeko portaera erakutsi zuten zizailadura bidez, zizailatze abiadura handitzen den heinean biskositatea txikiagotu egiten da, fluido ez-newtondarren ohiko portaera, 3D inprimaketarako egokia. Bestalde, berreskuratze-proban formulazio guztiek %65eko biskositate-berreskurapena gaintitu zuten zizailamendua eta gero, ondorioz metaketaren ondorengo berreskuratze azkarra islatuz.

2. irudia. Tinten karakterizazio erreologikoa: a) Zelulosa kontzentrazio desberdineko tinten biskositatea zizailadura abiaduraren funtzio gisa eta b) zelulosa kontzentrazio desberdineko tinten berreskuratze proba.

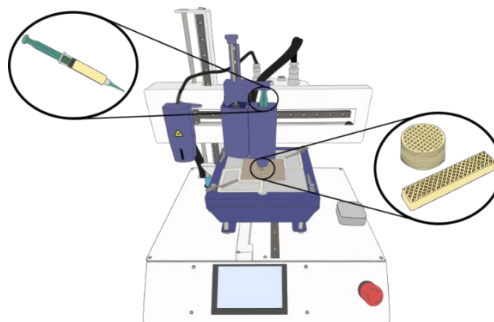


3D inprimaketarako bi modelo diseinatu ziren, bata zilindrikoa (21 mm x 21 mm x 10 mm) eta bestea laukizuzena (50 mm x 10 mm x 5 mm), karakterizazio mekaniko osoagoa egiteko. Prototipoak CAD Solid Edge-n modelatu ziren eta Cura 3D ijezketa-softwarean prozesatu ziren inprimaketarako jarraibeak sortzeko. Bi ereduak %75eko betetze dentsitatea dute, eta horri esker zelula-atxikidura eta -hazkuntza errazten dira, bai eta barne-zelulen oxigenazio egokia ere.

Konstruktua inprimatzeko 3D Domobio inprimagailua erabili zen. 30 °C-tan berotutako tinta 10 mL-ko Luer Lock xiringetan kargatu zen eta tenperatura berean inprimatu zen. Metaketa 16 °C-tan zeuden tefloizko xafletan egin zen, geruzen arteko atxikidura egokia ziurtatzeko baita egituraren egonkortasun ere. G18 plastikozko punta bat erabili zen, aurreko ikerketak jarraituz, 15 mm/s-ko inprimatze abiadurarekin.

Inprimaketa ondoren, konstruktua izoztu, liofilizatu eta labean 100 °C-tan lehortu ziren. Konstruktua hauen pisua prozesatu aurretik eta ondoren erregistratu zen. Erregistro hauetan pisu galtzea behatu zen, liofilizazioari eta lehortzeari egozten zaiena, prozesu hauek hondakin-ura kendu eta hasierako bolumena murrizten baitituzte.

3. irudia. 3D Domobio inprimagailua, tinta txertatuta eta konstruktua garatzen.



3.3 Karakterizazio kimikoa

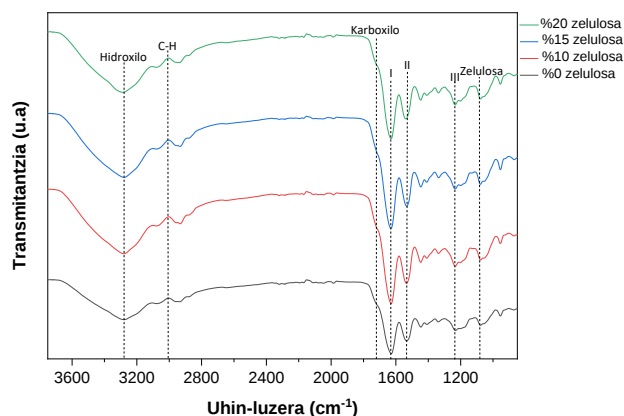
Fourierren transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR)

FTIRa biotintaren osagaien arteko elkarreaginak aztertzeko erabiltzen da. 4. irudiak lau konstruktua desberdinen FTIR espektroak erakusten ditu, talde funtzional esanguratsuenekin: hidroxilo taldea $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ -ean, C-H tenkatze-bibrazioak $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ -ean, azidoaren karboxilo

taldea 1700 cm^{-1} -ean, amida I ($\text{C}=\text{O}$) 1650 cm^{-1} -ean, amida II ($\text{N}-\text{H}$) 1550 cm^{-1} -ean, amida III ($\text{C}-\text{N}$) 1200 cm^{-1} -ean eta $\text{C}-\text{O}$ banda 1100 cm^{-1} -ean.

Zelulosa kontzentrazioa handiagotu ahala, $\text{C}-\text{O}$ taldeari dagokion bandaren intentsitatea areagotu egiten da. Horrek zelulosaren kontzentrazioa handitzen denean, laginaren hezetasun edukia ere handitu egiten dela adieraz dezake. $\sim 1735\text{ cm}^{-1}$ -ean dagoen karboxilo taldea, DESari zor zaio, kolin kloruroz eta azido zitrikoz osatuta. Azkenik, amida I, II eta IIIri lotutako bandak proteinen lotura peptidikoei dagozkie eta proteinen (SPI eta gelatina) eta erabilitako polisakaridoaren (zelulosa) arteko elkarrekintza fisiko ona berresten dute.

4. irudia. Zelulosa kontzentrazio desberdineko tinten FTIR espektroak.



Ekorketazko elektroik-mikroskopia (SEM)

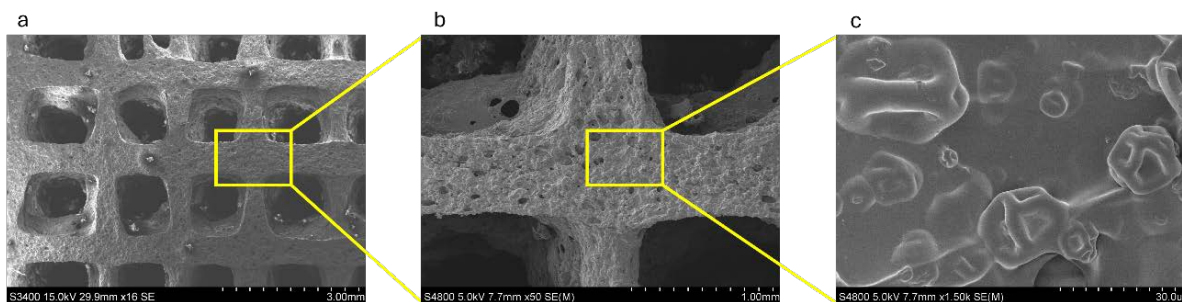
Konstruktuen ezaugarri morfologikoak ebaluatzeko SEM erabiltzen da. 5a irudian ikus daitekeenez, konstruktua inprimatze definizio ona du, zeharkako lerro definituak erakutsiz. Irudian puntu zuri batzuk agertzen dira, DESak askatutako azido zitrikoarekin erlazioa izan dezaketenak.

DESei buruzko informazio espezifikoak substantzia toxikoak aska ditzaketela iradokitzen du, hala ere, kontrolatutako mailetan, efektu hauek ez toxikoak izan daitezke. Baldintza jakin batzuetan, konposatu toxikoaren kontzentrazioa behar bezala kontrolatuz gero, litekeena da osasunarentzat arrisku esanguratsurik ez ekartzea (Popović et al., 2023).

5b irudian handipena areagotzerakoan, soja proteinari (izaera globularreko proteina bati) dagozkion egitura globularrak ikus daitezke (5c irudia).

Oro har, egitura homogeneo bat ikus daiteke, osagai guztien arteko bateragarritasuna adierazten duena, hala nola, SPIarena, txerri gelatinarena eta zelulosarena, FTIRean ikus daitezkeen bezala.

5. irudia. %15 zelulosa duen konstruktuen SEM irudiak handipen desberdinekin: a) x16, b) x50, c) x1,5k.



3.4 Ura xurgatzeko gaitasuna

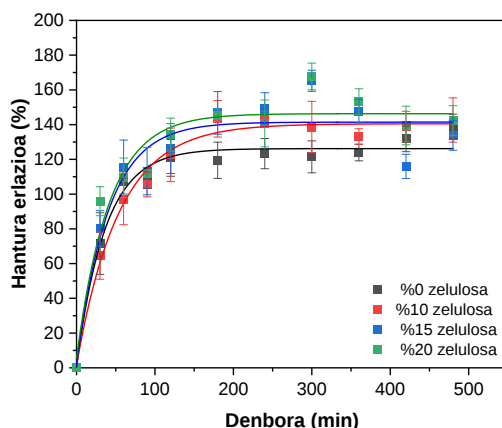
Konstruktua zenbat likido xurgatzen duen neurtzea bilatzen da, konstruktuen egonkortasunerako eta zelulekin eta ehunekin bateragarria izateko funtsezkoa baita. Ura

xurgatzeko gaitasuna grabimetrikoki kalkulatu zen baldintza fisiologikoetan, materialaren hantura eta degradazioa ebaluatzeko. Konstruktua uretan murgildu aurretik eta esperimentuan zehar, pisua denbora espezifikoetan erregistratu zen: 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 eta 480 minututan.

Zelulosa kontzentrazio bakoitzerako, hiru lagin independente aztertu ziren. Masaren aldaketa normalizatzeko, denbora bakoitzeko masaren eta hasierako masaren arteko aldea kalkulatu da, eta ondoren hasierako masakik zatitzen da. Desbideratze estandarra kalkulatzeko, neurketa denbora bakoitzean zelulosa kontzentrazio bakoitzerako egindako hiru errepikapenak hartu ziren oinarritzat.

6. irudia aztertuz gero, zelulosa duten konstruktuek hantura erlazio handiagoa dute (%140 ingurukoa), zelulosa ez duten konstruktuekin alderatuta (%120 inguru). Zelulosa kontzentrazio desberdinen hantura-erlazioak egonkortzeko joera du 200 minutuan.

6. irudia. Zelulosa kontzentrazio desberdineko konstruktuen hantura erlazioa denboraren funtzio gisa.



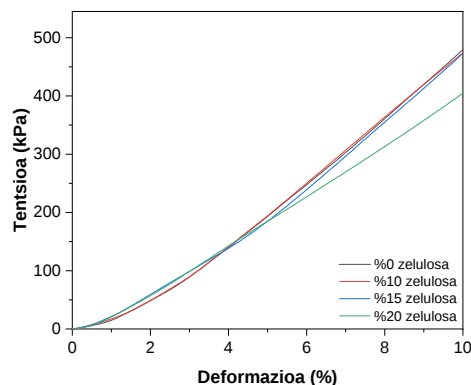
Bestalde, labean 24 orduz lehortzen egon eta gero, materialen degradazioa ebaluatu zen. Horretarako, degradazioaren ehunekoa zehaztu zen, hasierako masari lehortu ondorengo masa kenduz eta hau hasierako masakik normalizatuz. Datu hauek aztertuz, zelulosa kontzentrazio handiena zuten konstruktuek degradazio-ratiorik baxuena zutela ikusi zen, konstruktuei egonkortasuna emanez ehuna birsortzen den bitartean. Ondorioz, zelulosa gehitzeak uraren xurgatze gaitasuna handitzen du, baita materialaren osotasuna ere.

3.5 Karakterizazio mekanikoa

Konpresioa

Konpresio proban, konstruktuek %10eko deformazioa jasan zuten 1 mm/s-ko abiaduran. 7. irudian, konstruktua bakoitzaren (%0, %10, %15 eta %20 zelulosaren) tentsio-deformazio grafikoa ikus daiteke. Zelulosa kontzentrazio desberdin guztiek igoera esponentziala dute, nahiz eta %0, %10 eta %15 zelulosa duten konstruktuek, tentsiorik altuena erakutsi. Bestalde, %20 zelulosa duen konstruktua gradienterik baxuena du, %10eko deformazioaren aurrean tentsio baxuagoa erakutsiz.

7. irudia. Konpresio probaren grafikoa %10eko deformaziora arte, aztertutako konstruktuetarako.



1. taulak, lortutako Young modulua, tentsioa eta konstruktua bakoitzerako, %10eko deformaziorako, aplikatutako indar maximoa adierazten ditu. Young modulua bariazio txiki bat duela ikus daiteke %0, %10 eta %15 zelulosaren artean. Bestalde, %20 zelulosa duen konstruktua Young modulu baxuena du, 1,317 MPa-ekoa.

Bukatzeko, 1. taula erreparatur, zelulosa gehitzeak %10eko deformaziora iristeko beharrezko indarra gutxitzen du, Young modulu txikiagoa adieraziz eta tentsio txikiagoa lortuz.

1. Taula. Konpresio proban lortutako balioak zelulosa kontzentrazio desberdineko konstruktuentzat: aplikatutako indar maximoa, tentsioa eta Young modulua.

	Aplikatutako indar maximoa (kg)	Tentsioa (kPa)	Young modulua (MPa)
%0 zelulosa	11,226	490,1	1,655
%10 zelulosa	11,021	481,5	1,929
%15 zelulosa	10,983	480,9	1,728
%20 zelulosa	9,469	419,6	1,317

Testuren profil analisia (TPA)

TPA proban %15eko deformazioa ezarri zen. Proba honetan, konstruktuek bi konpresio jasan zituzten bata bestearen ondoren, haien propietate mekanikoak ebaluatzeko. 2. taulan gogortasun eta kohesio baloreak ageri dira, bigarren konpresioaren eta lehenengo konpresioaren azalaren arteko erlazioetik kalkulatur.

1 baliotik gertuen dagoen kohesio balioak, barne egiturak aldaketarik izan ez duela edo aldaketa gutxiago jasan dituela adierazten du, ia barne egitura guztia lehenengo eta bigarren konpresioen artean berreskuratuz.

Kasu honetan, aplikatutako deformaziorako, esperientziak erakutsi zuen, 0,8 baino kohesio handiagoa nahikoa dela materialak barne egitura arrakastaz berreskuratu duela zehazteko. Beraz, konstruktuen konposizio guztiek barne berreskurapen egokia zuten, kohesio irizpidearen arabera.

Gogortasuna aztertuz gero, kontrol konstruktua balio altuagoa zuen, konposizioan zelulosa pixka bat zutenekin alderatuta.

2. taula. TPA proban lortutako zelulosa kontzentrazio desberdineko konstruktuen gogortasuna eta kohesioa.

	Gogortasuna (kg)	Kohesioa
%0 zelulosa	9,335	0,848
%10 zelulosa	8,914	0,855
%15 zelulosa	7,588	0,839
%20 zelulosa	8,249	0,843

Lortutako emaitzek adierazten zuten zelulosa gehitzeak ez zuela konstruktuen kohesioa aldatzen.

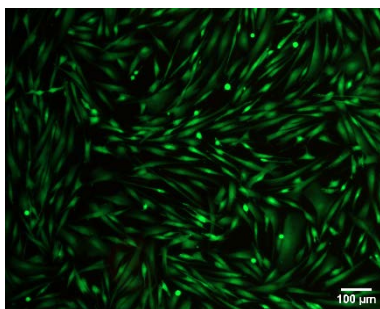
3.6 Biobateragarritasuna

8. irudiak Zelula Bizien/Hilen Bideragarritasun proban lortutako emaitzak aurkezten ditu, zelulak konstruktuekin kontaktuan egun bat, hiru egun eta zazpi egun egun ondoren.

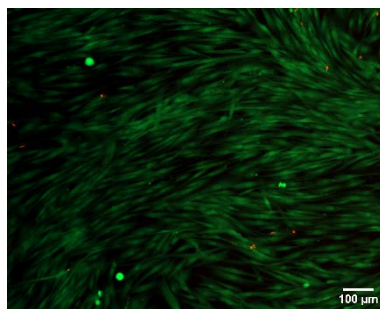
Irudiak behatzerakoan, zelulak entsegu aldian ugaitu zirela antzematen da, zelulen dentsitatea handituz eremu berean, denbora puntu ezberdinetan. Zelula bizien eta osasuntsuen presentziak zelulen bideragarritasun handia iradokitzen du, ingurune esperimentalean homeostasia mantentzeko gaitasun optimoa adieraziz.

8. irudia. Zelula Bizien/Hilen Bideragarritasun probako irudiak, 1, 3 eta 7 kultibo egunetan zehar.

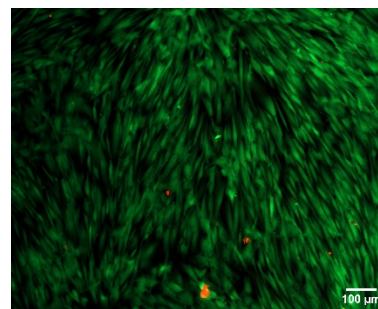
1. eguna



3. eguna



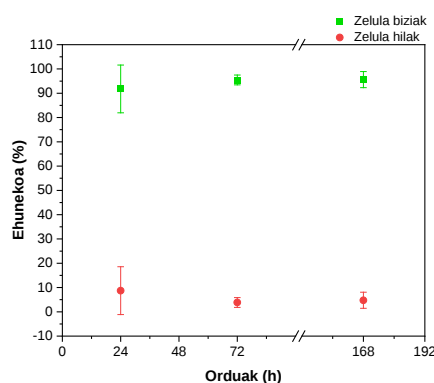
7. eguna



9. irudiak, zelula bizien eta hilen ehunekoa erakusten du, zelula-segmentazioaren bidez egindako analisi kuantitatibo batetik abiatuta, ImageJren bitartez (*ImageJ*, d. g.).

Analisia, kikara bereko hainbat irudirentzat burutu zen, zelula segmentatuen batez bestekoa eginez eta laginak CTR+ (zelula biziak) eta CTR- (zelula hilak) kontrolekin normalizatuz.

9. irudia. Zelula Bizien/Hilen Bideragarritasun probako irudien analisi kuantitatibotik lortutako zelula bizi eta hilen ehunekoa erakusten duen grafikoa.



Aztertutako egun guztietan, zelula bizien ehunekoak zelula hilen ehunekoa gainditzen du, %95eko bideragarritasun zelularra erakutsiz eta zelula hilak %5a baino gutxiago izanik. Emaita hauek, ISO 10993-5:2009 arauarekin bat datoz, izan ere %70etik gorako bideragarritasun zelularra duen materiala, biobateragarri bezala onartzen baitu (*UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sani...*, d. g.).

4. Ondorioak

Ikerketa honek, proteinetan oinarritutako lau soluzio desberdin, garatzea eta estrusioan oinarritutako 3D inprimagailu bidez, inprimatzea ahalbidetu du. Lau soluzio hauek zelulosa kontzentrazioagatik bereizten dira, %0, %10, %15 eta %20. Inprimaketa 30 °C-tan egin zen, tintak gel egoeran mantenduz prozesu osoan zehar. Proba mekaniko eta egiturazkoetatik abiatuta, formulazio optimo gisa %15 zelulosa zuen tinta aukeratu zen. Aukeraketa horren ondorioz, zelula bizien/hilen bideragarritasun proba egin zen %15 zelulosa zeukaten konstruktuek erabiliz. Proba honek, zelulen %95 baino gehiagok bizirauten zutela frogatu zuen, garatutako formulazioaren biobateragarritasuna berretsiz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ondorioetan oinarrituta, etorkizunari begira formulazioak etorkizuneko aplikazio medikoetarako potentzial handia du, 3Dko konstruktuek sortzeko baita biotinta gisa ere, zelulak zuzenean tintan erantsita egongo liratekeelako, ondoren inprimatzeko. Gainera, propietate mekaniko onen eta biobateragarritasunaren konbinazioak, ehun konplexuen ingeniaritza ikertzeko

edota *in vitro* modeloetan, proba farmakologikoetarako aukera irekitzen du. Etorkizuneko ikerketak epe luzerako portaera optimizatzen eta eremu fisiologiko dinamikoetan haien erantzuna ebaluatzen bidera litezke.

6. Erreferentziak

- Attaran, M. (2017/). The rise of 3-D printing: The advantages of additive manufacturing over traditional manufacturing. *Business Horizons*, 60(5), 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.bushor.2017.05.011>
- Cui, X., Li, J., Hartanto, Y., Durham, M., Tang, J., Zhang, H., Hooper, G., Lim, K., & Woodfield, T. (2020/). Advances in Extrusion 3D Bioprinting: A Focus on Multicomponent Hydrogel-Based Bioinks. *Advanced Healthcare Materials*, 9(15), 1901648. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901648>
- Da Silva, K., Kumar, P., Choonara, Y. E., Du Toit, L. C., & Pillay, V. (2020/). Three-dimensional printing of extracellular matrix (ECM)-mimicking scaffolds: A critical review of the current ECM materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(12), 2324–2350. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36981>
- Etxabide, A., Long, J., Guerrero, P., de la Caba, K., & Seyfoddin, A. (2019/). 3D printed lactose-crosslinked gelatin scaffolds as a drug delivery system for dexamethasone. *European Polymer Journal*, 114, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.02.019>
- Garcia-Orue, I., Santos-Vizcaino, E., Uranga, J., De La Caba, K., Guerrero, P., Igartua, M., & Hernandez, R. M. (2023/). Agar/gelatin hydro-film containing EGF and Aloe vera for effective wound healing. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(29), 6896–6910. <https://doi.org/10.1039/D2TB02796H>
- Hasan, M. M., Ahmad, A., Akter, M. Z., Choi, Y.-J., & Yi, H.-G. (2024/). Bioinks for bioprinting using plant-derived biomaterials. *Biofabrication*, 16(4). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ad6932>
- ImageJ. (d. g.). Berreskuratua 2025(e)ko urtarrilaaren 29(e)an, hemendik: <https://imagej.net/ij/>
- Las Heras, K., Santos-Vizcaino, E., Garrido, T., Borja Gutierrez, F., Aguirre, J. J., De La Caba, K., Guerrero, P., Igartua, M., & Hernandez, R. M. (2020/). Soy protein and chitin sponge-like scaffolds: From natural by-products to cell delivery systems for biomedical applications. *Green Chemistry*, 22(11), 3445–3460. <https://doi.org/10.1039/D0GC00089B>
- Leu Alexa, R., Iovu, H., Ghitman, J., Serafim, A., Stavarache, C., Marin, M.-M., & Ianchis, R. (2021/). 3D-Printed Gelatin Methacryloyl-Based Scaffolds with Potential Application in Tissue Engineering. *Polymers*, 13(5), 727. <https://doi.org/10.3390/polym13050727>
- Popović, B. M., Gligorićević, N., Arandelović, S., Macedo, A. C., Jurić, T., Uka, D., Mocko-Blažek, K., & Serra, A. T. (2023/). Cytotoxicity profiling of choline chloride-based natural deep eutectic solvents. *RSC Advances*, 13(6), 3520–3527. <https://doi.org/10.1039/D2RA07488E>
- Portan, D. V., Ntoulas, C., Mantzouranis, G., Fortis, A. P., Deligianni, D. D., Polyzos, D., & Kostopoulos, V. (2021/). Gradient 3D Printed PLA Scaffolds on Biomedical Titanium: Mechanical Evaluation and Biocompatibility. *Polymers*, 13(5), 682. <https://doi.org/10.3390/polym13050682>
- UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sani... (d. g.). Berreskuratua 2025(e)ko urtarrilaaren 29(e)an, hemendik: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0044389>

7. Eskerrak eta oharrak

Egileek Eusko Jaurlaritzak emandako diru laguntza (IT1658-22) eskertzen dute.