Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California



Maestría en Ciencias

en Nanociencias

Desarrollo de un nanocomposito mediante la incorporación de nanomateriales en una matriz polimérica: síntesis, caracterización y biocompatibilidad

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Areli Munive Olarte

Ensenada, Baja California, México 2018 Tesis defendida por Areli Munive Olarte

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno Codirectora de tesis Dr. Josué David Mota Morales Codirector de tesis

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes



Dr. Sergio Fuentes Moyado Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez Directora de Estudios de Posgrado

Areli Munive Olarte© 2018 Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis. Resumen de la tesis que presenta **Areli Munive Olarte** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias con orientación en Bionanotecnología

Desarrollo de un nanocomposito mediante la incorporación de nanomateriales en una matríz polimérica: síntesis, caracterización y biocompatibilidad

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno Codirectora de tesis Dr. Josué David Mota Morales Codirector de tesis

En este trabajo, se utilizaron emulsiones con una fase interna del 80%vol (HIPEs) como plantilla para sintetizar estructuras porosas (poliHIPEs). La fase interna consistió en una mezcla eutéctica (DES) de ChCl:2Urea. Se utilizaron 3 diferentes monómeros, metil-metacrilato (MMA), lauril-acrilato (LA) y estearilmetacrilato (SMA) que constituyeron la fase continua, éstos se entrecruzaron con etilenglicol dimetacrilato (EDGMA) ó 1,4-butanediol diacrilato (BDA). Se utilizó el surfactante no-iónico Cithrol[™], el cual tiene una estructura tribloque. También se adicionó el 1%P de nanohidroxiapatita (NHA) respecto a la fase continua para co-estabilizar las HIPEs. La micro-estructura de la HIPE de MMA se observó con un microscopio confocal. Después de la polimerización de las HIPEs por radicales libres, éstos se lavaron por 24h con etanol en un extractor Soxhlet. Los monolitos se secaron y sus conversiones se determinaron gravimétricamente. Las morfologías de los poliHIPEs se estudiaron con SEM y µ-CT, dónde se visualizó que los poliHIPEs tenían una estructura porosa interconectada, con tamaños de poro <15µm. Para confirmar la incorporación de NHA en los poliHIPEs se realizó una difracción de rayos-X en pMMA-NHA y una segmentación de fases (polimérica-cerámica) en las imágenes de μ -CT. Se midió el módulo elástico y el esfuerzo de compresión de pMMA y pMMA-NHA. El poliHIPE con NHA mostró una reducción ≈50% en ambas mediciones. La biocompatibilidad de los poliHIPEs se evaluó mediante ensayos de viabilidad y proliferación celular en fibroblastos humanos (HFF-1) y en osteoblastos de ratón (MCET3-E1). También se evaluó la hemocompatibilidad de los poliHIPEs. Los resultados mostraron que éstos no son citotóxicos sino que promueven la proliferación celular. No se observó una producción significativa de las especies reactivas de oxígeno (ROS) entre los poliHIPEs con y sin NHA, tampoco con el control negativo. Por último, se determinó la producción de la fosfatasa alcalina (ALP) en MCET3-E1, a las 24h se incrementó en las células cultivadas con los poliHIPEs, sin embargo, la cantidad de ALP fue significativa (p>0.05) comparada con el control negativo hasta después de 120h. La síntesis de materiales porosos interconectados y funcionalizados con NHA utilizando HIPEs como plantillas es un método prometedor en la ingeniería del tejido óseo.

Palabras clave: DES, HIPEs, poliHIPEs, porosidad interconectada, biocompatibilidad.

Abstract of the thesis presented by **Areli Munive Olarte** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences with orientation in Bionanotechnology

Development of a nanocomposite by incorporation of nanomaterials in a polymeric matrix: synthesis, characterization and biocompatibility

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno Thesis Codirector Dr. Josué David Mota Morales Thesis Codirector

In this work, emulsions with an internal phase of 80 vol% (HIPEs) were used as templates to synthesize porous structures (polyHIPEs). The internal phase consisted of a deep eutectic solvent (DES) of ChCI:2Urea. Three different monomers were used, methyl-methacrylate (MMA), lauryl-acrylate (LA) and stearylmethacrylate (SMA) as continuous phase, these were crosslinked with ethylene glycol dimethylacrylate (EGDMA) or 1, 4-butanediol diacrylate (BDA). The surfactant Cithrol[™], a non-ionic with a triblock structure, was used. Also, 1wt% of NHA (nanohydroxyapatite) was added with respect to the continuous phase to stabilize the HIPEs. The micro-structure of the HIPE of MMA was observed with a confocal microscope. After HIPEs polimerization by free radicals, the resultant polyHIPEs were washed with ethanol in a Soxhlet extractor for 24h. The monoliths were dried, and its conversions was determined gravimetrically. The morphologies of the polyHIPEs were studied with SEM and μ -CT, visualizing that these have an interconnected porous structure, with pore size <15 μ m. To confirm the incorporation of NHA in the polyHIPEs an X-ray diffraction was performed on pMMA-NHA and a phase segmentation (polymerceramic) in the images was obtained by μ -CT. The elastic modulus and crush strength of pMMA and pMMA-NHA was measured and a reduction ≈50% was observed in both measurements in polyHIPE MMA-NHA. The biocompatibility of the polyHIPEs was evaluated through viability and cell proliferation test in human fibroblast (HFF-1) and mouse osteoblasts (MCET3-E1). The hemocompatibility of the polyHIPEs was also tested. The results showed that the polyHIPEs are not cytotoxic, but promote cell proliferation. No significant production of reactive oxygen species (ROS) was observed between polyHIPEs with and without NHA nor the negative control. Finally, the production of alkaline phosphatase (ALP) by osteoblast was determined, at 24h of culture with the polyHIPEs it was increased, however it was significant (p>0.05) compared to negative control only after 120 h of incubation with the cells. The synthesis of interconnected porous materials and its functionalization with NHA using HIPEs as templates is a promising method for bone tissue engineering.

Keywords: DES, HIPEs, polyHIPEs, interconnected porosity, biocompatibility.

Dedicatoria

A mi abuelo por confiar en mi

Agradecimientos

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) y al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad de realizar un posgrado. A mis profesores y demás personas que laboran en los centros por su apoyo durante mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por aportarme una beca de estudios para realizar la maestría, con número de registro 587972.

Quiero dar las gracias a mis asesores la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno y el Dr. Josué David Mota Morales por su invaluable guía y soporte en el proceso de tesis. Les ofrezco mi más sincero aprecio por las oportunidades que me ofrecieron para seguir aprendiendo.

Quiero agradecer a los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Fernando Díaz Herrera, la Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández y el Dr. Sergio Andrés Águila Puentes por sus valiosas observaciones en mis avances de tesis.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bionanotecnologia del CNyN-UNAM y en el laboratorio de polímeros en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, bajo la co-dirección de la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno y el Dr. Josué David Mota Morales, respectivamente.

Agradezco al Consejo del Programa de Posgrado (CPP) por darme la confianza de realizar una estancia en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) para finalizar mi tesis. Quiero agradecer a Dr. Arturo Carranza Barillas por su guía durante este proceso.

Al CFATA por brindarme su apoyo para realizar una estancia en sus instalaciones para finalizar mi tesis. Al Quiero agradecer el apoyo del Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales con Certificación en ISO g001:2008 a cargo del Dr. Rodrigo A. Esparza Muñoz, a la Dra. Miriam Rocío Estévez González, la M. en IQ. Alicia del Real López, la Dra. Genoveva Hernández Padrón, el M.I. Gerardo Antonio Fonseca Hernández y la Dra. Beatriz Marcela Millán Malo por su ayuda en la caracterización de mis materiales. También a las personas en el área administrativa, técnicos y compañeros de CFATA que hicieron que mi estancia fuera más agradable.

Al laboratorio universitario de microtomografía de rayos X, en especial al técnico Dante Arteaga Martínez. A los proyectos IMSS, ISSSTE-CONACYT 2016-2018 "Aplicación de nanobiotecnología en el desarrollo de andamios poliméricos para el cultivo de tejido", SEP-CONACYT Ciencia Básica 2016-2019 "Estudio de la interfaz en emulsiones altamente concentradas no acuosas y su impacto en la síntesis de materiales porosos jerárquicos para biomedicina y separación", PAPIIT 2018 "Nanocompositos macroporosos jerárquicos a partir de emulsiones gel *pickering* estabilizados por biopolímeros usando disolventes eutécticos no acuosos" e Infraestructura-CONACYT 269071 "Evaluación de la toxicidad de nanomateriales para su aplicación en biomedicina y bionanotecnología", por los recursos que aportaron para realizar esta tesis y a la Dra. Katrin Quester, técnico académico del Departamento de Bionanotecnología.

Agradezco a mi familia, en especial a mi abuelo, a mis padres y a Hugo quienes siempre me dan un apoyo incondicional en cada proyecto que tengo. También a mis amigos por su enorme amistad y confianza durante este proceso.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi

Capítulo 1. Introducción

1.1 Generalidades de la ingeniería de tejidos y sus aplicaciones	1
1.1.1 La ingeniería del tejido óseo	2
1.2 Retos en la aplicación de materiales convencionales en la ingeniería de tejidos	3
1.3 La biocompatibilidad de los andamios celulares	4
1.4 La nanotecnología y sus aplicaciones en la ingeniería de tejidos	5
1.5 La nanohidroxiapatita en la ingeniería de tejido óseo	6
1.6 Antecedentes	6
1.6.1Química Verde	6
1.6.2 Los líquidos iónicos 8	8
1.6.3 Disolventes eutécticos profundos	10
1.6.4 Polimerización por radicales libres en DESs con monómeros como HBD	13
1.6.5 Emulsiones altamente concentradas	14
1.6.6 PoliHIPES tipo <i>pickering</i>	17
1.7 Justificación	19
1.8 Hipótesis 1	19
1.9 Objetivos	20
1.9.1 Objetivo general	20
1.9.2 Objetivos específicos	20

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntes	is del DES.								21
2.2 Caracterización del DES						22			
2.2.1 (FTIR)	Análisis	por	espectroscopía	infrarroja	con	transformada	de	Fourier	22

2.2.2 Análisis H1NMR	22
2.2.3 Análisis DSC	23
2.2.4 Determinación de la viscosidad	24
2.3 Preparación de la emulsion	24
2.4 Caracterización de la emulsión	26
2.5 Polimerización de la emulsión	27
2.6 Caracterización de los poliHIPEs	28
2.6.1 Microscopio electrónico de barrido	28
2.6.2 Microtomografía de rayos X	29
2.6.3 Difracción de rayos X	29
2.6.4 Pruebas mecánicas	29
2.7 Estudios de biocompatibilidad	30
2.7.1 Materiales	30
2.7.2 Determinación de la proliferación celular en fibroblastos HFF-1 mediante el ensayo de reducción de CFDA-SE	31
2.7.3 Determinación de la viabilidad celular en fibroblastos HFF-1	33
2.7.4 Determinación de la proliferación celular en osteoblastos de ratón mediante el ensayo de reducción de la rezasurina	34
2.7.5 Detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en osteoblastos y fibroblastos	35
2.7.6 Ensayos de diferenciación en osteoblastos de ratón mediante la detección de fosfatasa alcalina	37
2.7.7 Evaluación de la hemocompatibilidad de los poliHIPEs	38

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización del DES	40
3.1.1 Análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	40
3.1.2 Análisis H1 NMR	41
3.1.3 Análisis DSC	45
3.1.4 Determinación de la viscosidad	46
3.2 Caracterización de la emulsión	47
3.2.1 Microscopía confocal	47
3.3 Caracterización de los poliHIPEs	48
3.3.1 Microscopía electrónica de barrido	48
3.3.2 Microtomografía de rayos X (μ-CT)	51
3.3.3 Difracción de rayos X	54
3.3.4 Pruebas mecánicas	54

3.4 Resultados de Biocompatibilidad	55
3.4.1 Resultados de la viabilidad celular de HFF-1	55
3.4.2 Resultados de la proliferación celular de HFF-1	56
3.4.3 Resultados de la determinación de la proliferación de osteoblastos de ratón MC3T3-E1	57
3.4.4 Determinación del estrés oxidativo para los fibroblastos de humano HFF-1	59
3.4.5 Determinación del estrés oxidativo en osteoblastos de ratón MC3T3-E1	59
3.4.6 Resultados del ensayo fosfatasa alcalina	61
3.4.7 Resultados de hemólisis	62

Capítulo 4. Discusión

4.1 DES	64
4.2 HIPEs	65
4.3 PoliHIPEs	66
4.4 Biocompatibilidad	68

Capítulo 5. Conclusiones

Literatura citada	80

78

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de cationes y aniones de ILs típicos	.9
Figura 2. Diagrama de fase que representa una mezcla eutéctica	10
Figura 3. Deformación de las gotas en una HIPE	15
Figura 4. Micrografía SEM de un poliHIPE de poly(DVB)	16
Figura 5. A) Imagen confocal de una HIPE de MMA B) Microscopía SEM de un poliHIPE de MMA	17
Figura 6. Estructura de los componentes del DES	21
Figura 7. Componentes del DES (ChCl:2urea)	21
Figura 8. Estructura de los reactivos en la fase continua: monómeros (MMA, LA, SMA), entrecruzantes (EDGMA, BDA), surfactante (Cithrol) e iniciador (AIBN)	25
Figura 9. a) HIPE de MMA b) HIPE de MMA con NHA	26
Figura 10. Estructura de la rodamina 6G	26
Figura 11. Emulsiones HIPE marcadas con Rh6G	27
Figura 12. a) HIPE y b) PoliHIPE	28
Figura 13. Gráfica tensión-deformación de pMMA-NHA	30
Figura 14. Curva de calibración de los osteoblastos	35
Figura 15. Espectro de ChCl y del DES (ChCl:2Urea).	40
Figura 16. Enlaces de hidrógeno formados entre la urea y el ChCl	12
Figura 17. Espectro de NMR ¹ H del DES en un tubo capilar.	14
Figura 18. Valores de las señales de NMR 1H de las moléculas de la urea y el cloruro de colina	14
Figura 19. Termograma DSC del DES (ChCl: 2Urea).	45
Figura 20. Viscosidad en función de la temperatura del DES (ChCl:2Urea)	46
Figura 21. Imagenes confocales de la HIPE de MMA antes de la polimerización	17
Figura 22. Imagen confocal de la HIPE- Pickering desestabilizada de MMA con NHA	18
Figura 23. Micrografía SEM de pMMA después de la extracción de la fase interna (DES)	19
Figura 24. Micrografía SEM pMMA-NHA después de la extracción de la fase interna (DES)	49
Figura 25. Micrografía SEM de los poliHIPEs después de la extracción de la fase interna (DES)	50

Figura 26. Micrografía SEM de los poliHIPEs después de la extracción de la fase interna (DES)50
Figura 27. (a) pMMA-NHA segmentado en un cubo, (b) poros segmentados de la muestra pMMA-NHA, (c) slice mostrando matriz y poros, (d) slice mostrando los poros segmentados
Figura 28. (ay b) Visualización 3D de la NHA en la muestra PMMA-NHA (c) poros de la muestra pMMA- NHA, (d) poros segmentados de la muestra pMMA-NHA53
Figura 29. Patrón de XRD de polvo de NHA pura, de pMMA y pMMA-NHA con 1% de NHA54
Figura 30. Esfuerzo de compresión y B) Módulo elástico de pMMA y pMMA-NHA55
Figura 31. Ensayo de viabilidad celular de los fibroblastos de humano HFF-1 en presencia de pLA y pLA- NHA
Figura 32. Los poliHIPEs promovieron la proliferación celular de los fibroblastos.
Figura 33. Número de células que se adhirieron y proliferaron en los PoliHIPEs58
Figura 34. Incremento en el número de células que se adhirieron y proliferaron en los poliHIPEs58
Figura 35. Niveles de ROS en fibroblastos de humano HFF-160
Figura 36. Niveles de ROS en osteoblastos de ratón MC3T3-E160
Figura 37. Los poliHIPEs promueven la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) en los osteoblastos61
Figura 38. Diferenciación en osteoblastos de ratón MC3T3-E162
Figura 39. Los 6 poliHIPEs presentaron un porcentaje inferior al permitido (<5%)63
Figura 40. Estructura de los monómeros ocupados para la síntesis de los poliHIPEs
Figura 41. Representación esquemática de la emulsión HIPE sintetizada en este trabajo77
Figura 42. Visualización 3D de la porosidad del poliHIPE pMMA-NHA77

х

Lista de tablas

Tabla 1. HBA y HBD de DESs típicos	11
Tabla 2. Comparación entre el espectro de FTIR del ChCl y el DES.	43
Tabla 3. Desplazamientos químicos de los H ¹ encontrados en el DES con sus respectivas integrales	44
Tabla 4. Resumen de las propiedades morfológicas de los PolyHIPEs.	51
Tabla 5. Distribución de tamaños de los poros de pMMA-NHA	53
Tabla 6. Resumen de las características de algunos de los polyHIPEs citados en este trabajo	76

Capítulo 1. Introducción

1.1 Generalidades de la ingeniería de tejidos y sus aplicaciones

El daño en los tejidos y los órganos es considerado un problema de salud; de acuerdo al Observatorio Mundial de Donación y Trasplantes (GODT, por sus siglas en inglés *Global Observatory on Donation and Transplantation*) en 2015 se trasplantaron 126,670 órganos en todo el mundo, de los cuales 2,960 se realizaron en México (GODT, 2017). El número de personas que esperan un trasplante de órgano, la escasez de los donadores y el envejecimiento de la población han promovido el desarrollo de nuevas tecnologías que aspiren a disminuir el número de trasplantes que son requeridos y puedan mitigar la escasez de los donadores, para restaurar las funciones de los tejidos y los órganos dañados (Womba y Jordana 2016).

En este sentido, la ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria que conjunta la física, la química, la ingeniería de materiales y las ciencias de la vida, con la finalidad de desarrollar estructuras biológicas para la reparación parcial o total de los tejidos y los órganos perdidos por daño o enfermedad (Shafiee y Atala, 2017).

Esta área se basa en el uso de estructuras porosas fabricadas de biomateriales, células y factores de crecimiento, llamadas típicamente andamios celulares. Los andamios tridimensionales son sintetizados de materiales tanto sintéticos como naturales y proveen una plataforma para la migración y adhesión de células en su superficie, al mimetizar las características del tejido u órgano que se intenta reparar. Su estructura porosa interconectada, asegura la penetración celular y la difusión de nutrientes hacia las células dentro del material y hacia la matriz extracelular. Además, permite la liberación de productos de desecho y subproductos de su degradación (O'Brien, 2011). Los andamios deben ser biocompatibles y biodegradables para evitar la necesidad de una cirugía para retirarlos, por lo tanto, su tiempo de degradación tiene que acoplarse con el de la formación del tejido nuevo (Li y Wang, 2012).

Existe una gran variedad de tejidos y órganos que se pueden beneficiar con el uso de los andamios celulares, como lo son: el hueso, cartílago y órganos enteros. Hasta ahora el mayor éxito se ha alcanzado al implantar estructuras para la regeneración de piel, vejiga, tráquea y hueso (Atala *et al.*, 2012).

1.1.1 La ingeniería del tejido óseo

En 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó la esperanza de vida global en 71.4 años; en promedio se ha incrementado 39 años en las últimas 7 décadas. Sin embargo, la prevalencia de diferentes discapacidades o enfermedades aumenta con la edad y solo algunos adultos mayores pueden gozar de buena salud.

Una de las mayores causas de discapacidad de las personas mayores es la osteoporosis, una enfermedad que se caracteriza por la disminución de la densidad ósea.

El hueso es un compósito altamente estructurado que está compuesto de fases de hidroxiapatita (HA) y colágeno. Sus principales funciones son dar el soporte y la locomoción al cuerpo, por lo tanto, la pérdida de la masa ósea es suficiente para causar una fractura (Sözen *et al.*, 2016). Globalmente, en personas de más de 50 años las fracturas por osteoporosis afectan aproximadamente a una de cada tres mujeres y a uno de cada cinco hombres (Yousefi *et al.*, 2016). La osteoporosis y las fracturas tienen un gran impacto en la calidad de vida y sus costos rebasan al cáncer de mama y de próstata. De acuerdo al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las fracturas de cadera se incrementaron en un 24.8% de 2000 a 2006. También, en 2006 se reportaron más de 97 millones de dólares en costos directos relacionados con las fracturas de cadera (Clark *et al.*, 2010). La manera de abordar esta enfermedad está restringida en este momento a fármacos y a trasplantes autógrafos o alógrafos (Sözen *et al.*, 2016).

Una nueva alternativa para el tratamiento de afecciones óseas es mediante el uso de la ingeniería de tejidos, que se basa en la comprensión de la estructura ósea, sus propiedades mecánicas, sus mecanismos y remodelación y que tiene como objetivo reparar o regenerar el hueso. Algunos principios de biología que son necesarios para la ingeniería del tejido óseo incluyen: 1) El uso de células madre pluripotenciales o multipotentes, 2) La identificación de genes, los factores de crecimiento y las señales de transducción que median la formación de hueso, 3) El proceso de remodelación ósea, 4) La importancia de las propiedades físicas del micro-entorno tisular, 5) Angiogénesis y neo-vascularización del tejido óseo recién formado (Amini *et al.*, 2012).

1.2 Retos en la aplicación de materiales convencionales en la ingeniería de tejidos

La aplicación de los materiales convencionales usados para la ingeniería de tejidos enfrenta muchos retos, tales como la infección, la inflamación, su biocompatibilidad, su biodegradabilidad, su vascularización y con el tiempo, la pérdida gradual de las propiedades mecánicas del implante. Hay diferentes especificaciones y propiedades que harán que un biomaterial sea óptimo para ser usado en el proceso de formación de un tejido, por ejemplo: i) biocompatibilidad; ii) biodegradabilidad; iii) estructura porosa 3D y iv) propiedades mecánicas, las cuales deberán ser consistentes con el sitio anatómico en el que será implantado (Atala *et al.*, 2012; Womba, 2016; Amini *et al.*, 2012).

Para facilitar las interacciones célula-superficie del material, son importantes algunas propiedades como el balance de hidrofilicidad/hidrofobicidad, el tamaño, la distribución y la interconectividad de los poros dentro del andamio. Se ha observado que la adhesión de células a biomateriales y por consiguiente su actividad, es generalmente superior en superficies hidrofílicas. Por ejemplo, materiales como el titanio y la hidroxiapatita (HA) son hidrofílicas, sin embargo, muchos polímeros utilizados en la ingeniería de tejidos son hidrofóbicos (Wilson *et al.*, 2005). Por ejemplo, la superficie de ácido poli(láctico co-glicólico) (PLGA) es hidrofóbica, y la superficie de la agarosa es hidrofílica. Esta diferencia, modula por ejemplo el fenotipo de las células T el cual es diferente entre estos dos biomateriales (Park *et al.*, 2014).

La unión covalente de proteínas adhesivas con los polímeros naturales se realiza de manera más sencilla, pero presentan una menor afinidad a moléculas terapéuticas. Estas moléculas que suelen utilizarse son heparina, fibronectina, laminina y factores de crecimiento como: proteínas morfogénicas del hueso (BMPs, por sus siglás en inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglás en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglás en inglés *Epidermal growth factor*). Algunos ejemplos de estos polímeros son: el quitosano, el alginato, el ácido hialurónico y el colágeno (Pérez *et al.*, 2012). Las ventajas de estos materiales biológicos son su disponibilidad, relación costo/efectividad y la escala de producción (Wiles *et al.*, 2016).

Otro de los retos de la ingeniería de tejido ósea, es la producción de andamios celulares con propiedades mecánicas adecuadas, principalmente para la regeneración de cartílago o hueso. Para estos tejidos, el biomaterial debe tener suficiente integridad mecánica para funcionar durante todo el tiempo de la implantación y hasta terminar el proceso de remodelación del tejido (O'Brien, 2011), por lo tanto, las propiedades mecánicas del andamio deberán coincidir con las del tejido óseo hospedero. Sin embargo, sí la porosidad del andamio es muy alta, puede inducir una pérdida gradual de su integridad mecánica. Una

estrategia para superar este reto es combinar materiales diversos tales como cerámicas y polímeros en la síntesis de los andamios para crear un balance entre la fuerza y la dureza del material. Se han utilizado diferentes polímeros para la construcción de estos andamios, como el polimetilmetacrilato (PMMA), el ácido poliláctico (PLA), el polihidroxibutirato (PHB) y la policaprolactona (PCL). La cerámica más utilizada es la hidroxiapatita (HA). Ésta es un compuesto que se encuentra en el hueso de manera natural y su incorporación en andamios estructurales ha incrementado la osteoconductividad, la capacidad de que células óseas crezcan en la superficie de un implante (Yousefi, 2016). Además, se ha utilizado en combinación con otros materiales para mejorar sus propiedades mecánicas (Nath *et al.*, 2010).

Los requerimientos de los materiales biodegradables dependen de su uso y aplicación futura. Los biomateriales que se utilicen en la síntesis y los metabolitos de su degradación no deberán tener efectos mutagénicos, genotóxicos, carcinogénicos u otros efectos tóxicos (Shafiee y Atala, 2017). Sin embargo, la característica más importante para elegir materiales en la ingeniería de tejidos, su biocompatibilidad.

1.3 La biocompatibilidad de los andamios celulares

La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un material/dispositivo de desempeñar su función destinada, sin provocar un efecto local o sistémico indeseable en el hospedero. Hay tres factores que determinan la biocompatibilidad de un material específico: i) La aplicación en la que se desee usar, ya que pueden existir casos en que sea necesario que el material sea reactivo con los tejidos y otros en que sea inerte. ii) Las características del material, aquellas que pueden influir en la respuesta del hospedero son las siguientes: composición del material (incluyendo el contenido de agua); topografía entre las que se incluyen micro y nano-estructura, morfología, macro-, micro- y nano- porosidad; cristalinidad; propiedades eléctricas; propiedades de superficie como el balance de hidrofobicidad e hidrofilicidad (HLB); resistencia a la corrosión para materiales metálicos; perfil de degradación y de disolución; presencia de aditivos, contaminantes, etc. iii) La situación en la que el material es usado, la respuesta de una estructura puede variar dependiendo del sitio de implantación (Williams, 2008).

En general, las respuestas celulares que un material (andamio) puede desencadenar son: efectos citotóxicos; activación de neutrófilos y/o macrófagos; respuestas específicas del tejido/órgano; la adhesión, activación o agregación de plaquetas; activación del complemento; producción de anticuerpos;

hipersensibilidad/anafilaxis; genotoxicidad y la formación de tumores o teratomas (Atala *et al.*, 2012; Williams, 2008).

Por tanto, la biocompatibilidad en la ingeniería de tejidos se refiere a la capacidad de un andamio para funcionar como un sustrato que promueva la actividad celular apropiada. Lo que incluye el facilitar y/o promover señales moleculares y mecánicas, con el fin de optimizar la regeneración del tejido u órgano, sin provocar una respuesta local o sistémica en el hospedero.

1.4 La nanotecnología y sus aplicaciones en la ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un área multidisciplinaria que conecta diferentes disciplinas como la bioingeniería, la medicina, la biología y la ciencia de materiales. En ese sentido, la nanotecnología ofrece soluciones a los desafíos actuales que enfrenta la ingeniería de tejidos; ya que puede aportar herramientas y nanomateriales para controlar la interacción, localización, liberación y funcionalidad de biomateriales, células y biomoléculas; con el objetivo de crear un microambiente que guíe el desempeño del material biológico a escala celular y nanométrica (Shafiee y Atala, 2017).

Los nanomateriales presentan un área superficial grande y sus propiedades fisicoquímicas se pueden modificar con cambios en su tamaño, forma y composición química. La superficie de éstos se puede funcionalizar o recubrir con una variedad de ligandos como grupos funcionales, biomoléculas, dendrímeros, polímeros, aptámeros o anticuerpos. Esta funcionalización puede proveer especificidad en el reconocimiento, incorporar fármacos o hacer el nanomaterial biocompatible (Eung-Sam, 2014).

Para aprovechar estas ventajas, los andamios se pueden sintetizar con una estructura y topografía nanométrica con un área superficial grande que incremente el crecimiento celular y que además permita el transporte de nutrientes. Su diseño puede presentar características únicas para imitar microambientes específicos, con propiedades bioquímicas y mecánicas similares a los tejidos nativos. Además, la funcionalización y topografía así como la porosidad y el tamaño de poro pueden incrementar la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células para la regeneración del tejido/órgano (Li y Wang, 2012; Kim *et al.*, 2014).

1.5 La nanohidroxiapatita en la ingeniería de tejido óseo

Debido a la organización jerárquica del tejido óseo, una clave es la incorporación de características a nanoescala para replicar y mimetizar la dureza y durabilidad del hueso (Li y Wang, 2012).

Diversos nanocompuestos se han basado en la estructura sofisticada y la organización jerárquica del hueso que comprende fibras de colágeno y cristales de HA. Ambos confieren rigidez y permiten la organización de la matriz extracelular a diferentes magnitudes desde la escala nanométrica hasta la escala micrométrica (Liu *et al.*, 2016). Es por esta razón que tanto el colágeno como la HA se han utilizado en diversos materiales para mimetizar aquellos que se encuentran en el hueso de manera natural (Venkatesan y Kim, 2014).

Un nanomaterial importante en la ingeniería del tejido óseo es la nanohidroxiapatita (NHA); ésta tiene una mayor área superficial en comparación con la HA convencional, que puede facilitar e incrementar la adhesión celular, su proliferación, el depósito de calcio y la expresión de genes osteogénicos (Venkatesan y Kim, 2014; Liu *et al.*, 2016). Se ha observado que tiene una alta absorción de vitronectina, que es una proteína que promueve la adhesión de osteoblastos (Yousefi *et al.*, 2016). También se ha reportado que estimula la osteoconducción por el reemplazo gradual de hueso después de la implantación (Liu *et al.*, 2016). Además de los efectos celulares, se ha reportado que la NHA tiene la capacidad de inducir un bajo perfil de expresión de los genes involucrados en la interacción biomaterial-célula en la línea celular de osteoblastos MG-63, modulando así la interacción de las células con el andamio (Groen *et al.*, 2015).

1.6 Antecedentes

1.6.1 Química Verde

La química verde es el diseño de procesos y productos amigables con el medio ambiente para reducir o eliminar la generación de sustancias tóxicas (EPA, 2017).

La química verde se basa en 12 principios desarrollados por Anastas y Warner en 1998 y son los siguientes: 1) prevención, 2) economía atómica: deberán ser diseñados métodos sintéticos para maximizar la incorporación de las materias primas usados en los procesos, 3) síntesis de químicos menos tóxicos, 4) diseño de químicos seguros: los productos químicos deberán diseñarse para realizar su función deseada pero también disminuir su toxicidad, 5) solventes auxiliares y seguros, 6) diseño para la eficiencia de energía: minimizar la energía requerida en los procesos químicos de acuerdo a su impacto ambiental y económico, 7) utilizar materias primas renovables, 8) reducir derivativos: minimizar o reducir procesos químicos y físicos innecesarios, 9) catálisis, 10) diseño para la degradación: los productos químicos deberán ser diseñados para que al final de su función se degraden en productos que no persistan en el ambiente, 11) prevención de la contaminación por análisis en tiempo real: metodologías analíticas para monitorear y controlar la formación de sustancias tóxicas y 12) química segura inherente para la prevención de accidentes: las sustancias utilizadas se deberán seleccionar para minimizar el potencial de causar un accidente, incluyendo liberaciones, explosiones o incendios. Al practicar la química verde se crean alternativas a sustancias tóxicas, se diseñan procesos químicos para reducir y eliminar la demanda de recursos y se crean procesos que utilicen menores cantidades de energía y que sean más seguros para el usuario (ACS, 2018).

Los disolventes han recibido mucha atención debido a que se ocupan en grandes cantidades, especialmente en la purificación de productos. En general, éstos no participan en la reacción de formación del producto ya que no son componentes activos para la formulación, por lo tanto, se debería de reducir el uso de solventes tóxicos, inflamables o que produzcan daño al medio ambiente y a la salud humana (Byrne *et al.*, 2016). Desde 2007, los disolventes han sido regulados en Europa por el reglamento denominado Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias químicas (REACH, por sus siglas en inglés *Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*). Actualmente REACH ha restringido el uso de disolventes como el metanol, benceno, ciclohexano, triclorobenceno, cloroformo y tolueno, debido a su alto grado de toxicidad (ChemSafetyPro, 2018).

La definición de un "disolvente verde" se basa en dos evaluaciones denominadas: 1) medio ambiente, salud y seguridad (EHS, por sus siglas en inglés *Environmental, Health and Safety*) y 2) ciclo de vida (LCA, por sus siglas en inglés *Life-Cycle Assessment*). La evaluación EHS es un método para identificar los posibles daños de las sustancias químicas en etapas tempranas de un proceso químico. Las sustancias se evalúan en 9 categorías: probabilidad de liberación, explosividad y descomposición, toxicidad aguda, irritación y toxicidad crónica, persistencia y peligro al aire y agua. El ciclo de vida de los disolventes orgánicos comprende la producción petroquímica, su uso como medio de reacción en los procesos de producción química y el tratamiento de los residuos del disolvente. Los residuos se pueden reciclar por procesos de destilación o tratar en una planta incineradora de residuos (Capello, 2007). Los disolventes con una puntuación alta en las evaluaciones EHS y LCA deberán sustituirse por otros, mientras que los que tengan puntuaciones bajas serán los ideales para ser utilizados en los procesos químicos.

El agua, es el solvente ideal porque es barato, no es tóxico, no es inflamable, es renovable y seguro para el medio ambiente y la salud humana. Sin embargo, tiene limitaciones en algunos procesos químicos como en la polimerización que debido a su baja viscosidad y solubilidad de los monómeros se obtienen bajas conversiones; también, los procesos de purificación son difíciles y costosos cuando se contamina (Alonso *et al.*, 2016). Es por esta razón que cada vez se trata de disminuir el uso de los disolventes orgánicos convencionales y sustituirlos por otras alternativas, es así como se empezaron a utilizar los líquidos iónicos.

1.6.2 Los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (ILs, por sus siglas en inglés *lonic Liquids*) se definieron como una mezcla de sales orgánicas cuyo punto de fusión está por debajo de los 100°C. Sin embargo, ahora se definen como solventes que se constituyen de sólo iones (Smith *et al.*, 2014).

Se estima que el número de combinaciones posibles es 10⁶ para mezclas binarias y 10¹⁸ para terciarias (Dong *et al.*, 2017; Kubisa, 2009).

Los ILs se agrupan en 3 generaciones, la primera generación de ILs se basaron en sales como cloroaluminatos ([AlCl₄]⁻), los cuales son líquidos a temperatura ambiente. La segunda generación reemplazó este anión sensible a la humedad por iones como tetrafluoroboratos ([BF₄]⁻) y hexafluorofosfatos ([PF₆]⁻). Y en la tercera generación al anión, y/o al catión se les incorporó covalentemente un grupo funcional como parte de la estructura para tener propiedades físicas y/o químicas adicionales (Rohit, 2017).

La relación estructura-propiedad es fundamental para entender el comportamiento de los ILs, pero resulta difícil generalizar sus propiedades. Éstas pueden variar considerablemente dependiendo de la estructura de los cationes y de los aniones (**Figura 1**) (Kubisa, 2009; Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010).



Figura 1. Estructura química de cationes y aniones de ILs típicos. (Dong et al., 2017).

Los ILs son solventes muy versátiles y sus propiedades pueden ajustarse fácilmente para ser utilizados en aplicaciones específicas. Éstos se han considerado como sustitutos de solventes orgánicos volátiles debido a su alta estabilidad térmica y baja volatilidad. El primer líquido iónico reportado a temperatura ambiente fue el nitrato de etilamonio [EtNH₃]⁺[NO₃]⁻ con un punto de fusión de 12°C. Los ILs exhiben un amplio espectro de conductividad desde 0.1 a 20 mS/cm que puede variar por la viscosidad, el tamaño del ión, la agregación y la deslocalización de la carga iónica. También, la densidad de los ILs es mayor que la de otros solventes orgánicos o que del agua, y su viscosidad es de 1 a 3 veces más alta que la de los disolventes convencionales (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010). Debido a la alta estabilidad térmica y química de los ILs, éstos se han utilizado en la química de polímeros debido a que moderan las reacciones al reducir el calor producido, principalmente por las reacciones exotérmicas. Por ejempo, Vijayaraghavan *et al.* (2004) evaluaron la polimerización térmica del estireno y el acrilonitrilo por medio de la utilización del líquido iónico N-butil, N-metil pirrolidona bis (trifluorometanosulfonico) amida [P_{1,4}][Tf2N]. Los resultados mostraron que la polimerización fue un proceso seguro porque se disminuyó la actividad exotérmica; además se disminuyó la descomposición exotérmica del producto, la cual es la principal fuente de gases tóxicos.

Se ha observado que, a pesar del potencial de los ILs para ser usados en reacciones químicas, éstos pueden reaccionar con algunos compuestos, por lo tanto, han dejado de considerarse como solventes inertes.

También, se ha cuestionado su baja biodegradabilidad, biocompatibilidad y sustentabilidad (Mbous *et al.*, 2016; Li y Row, 2016).

1.6.3 Disolventes eutécticos profundos

Los disolventes eutécticos profundos (DES, por sus siglas en inglés *Deep Eutectic Solvents*) surgieron como análogos de los líquidos iónicos porque comparten muchas de sus propiedades y características. Aunque los términos DES e ILs se utilizan indistintamente, éstos son dos tipos diferentes de disolventes (Smith *et al.*, 2014).

Una mezcla eutéctica es una composición única de dos o más sólidos inmiscibles que sufren un cambio completo de fase, de sólidos a líquidos a una temperatura precisa (**Figura 2**). El punto eutéctico es la temperatura de fusión mínima de todo el conjunto de composiciones. Un disolvente eutéctico (DES) está formado por una mezcla eutéctica de dos o más sólidos que son líquidos a temperatura ambiente (Alonso *et al.*, 2016).

Los DES difieren de los ILs en el proceso de formación química y en la fuente de los materiales iniciales. Los DES están conformados por una mezcla que consiste en un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), como las sales de amonio cuaternarios y en un donador de enlaces de hidrógeno (HBD) (**Tabla 1**). Los DES pueden ser especies no-iónicas, en contraste con los ILs que se forman a través de enlaces iónicos.



Figura 2. Diagrama de fase que representa una mezcla eutéctica (modificado de Alonso et al., 2016).

НВА	p.f.	HBD	p.f.	Relación molar	DES
ChCl	303	Urea	134	01:02	11. C
ChCl	303	Tiourea	175	01:02	69
ChCl	303	1-metil urea	93	01:02	29
ChCl	303	1,3-dimetil urea	102	01:02	70
ChCl	303	1,1-dimetil urea	180	01:02	149
ChCl	303	Acetamida	80	01:02	51
ChCl	303	Ácido cítrico	149	01:01	69
ChCl	303	Ácido oxálico	190	01:01	34
ChCl	303	Ácido malónico	134	01:01	10
ChCl	303	Ácido succínico	185	01:01	71
ChCl	303	MgCl ₂ :6H ₂ O	116	01:01	16
Ácido tartárico	168-170	DMU	101-104	03:07	70
Ácido cítrico	153	DMU	101-104	02:03	75
L-Carnitina	197	Urea	134	02:03	74
L-Prolina	205	Ácido oxálico	190	01:01	-14.5

Tabla 1. HBA y HBD de DESs típicos (Smith et al., 2014; Alonso et al., 2016).

DMU: N,N'dimetilurea, p.f.: punto de fusión, T.f.: temperatura de fusión.

Los DES también poseen ventajas sobre los ILs en los bajos costos de preparación, el bajo impacto ambiental y la disponibilidad de los componentes y éstos se representan con la siguiente fórmula:

$$Cat^{+} X^{-} z Y$$
 (1)

Donde: Cat^{+} es un catión, normalmente amonio, fosfonio o sulfonio y X es una base de Lewis, generalmente un anión haluro. Las especies aniónicas se forman entre X⁻ y un ácido (Y) de Lewis o de BrØnsted (z se refiere al número de moléculas de Y que interactúan con el anión). Los DES se clasifican dependiendo de la naturaleza de los reactivos que utilizan (Smith *et al.*, 2014).

La mayoría de los estudios sobre DES se enfocan en las mezclas de sales cuaternarias de amonio, siendo el *cloruro de colina* $[HOC_2H_4N^+(CH_3)_3Cl^-]$ el más usado. Las mezclas de cloruro de colina (ChCl) y urea con una relación 1:2 respectivamente, producen un DES descrito por Abbot *et al.* (2003) que tiene un punto de congelamiento *(freezing point)* de 12°C. Éste es considerablemente menor que el punto de fusión (p.f.) de cualquiera de sus constituyentes (p.f. cloruro de colina=302°C y p.f. urea= 133°C) y permite que se utilice como disolvente a temperatura ambiente.

La reducción significativa del punto de fusión se debe a que la urea tiene una alta capacidad para formar enlaces de hidrógeno con los iones de cloruro (Smith *et al.*, 2014). El punto de fusión también disminuye cuando los átomos de uno de los componentes son pequeños y se pueden posicionar entre los espacios intersticiales de una red formada por átomos más grandes, los átomos más pequeños interrumpen su patrón cristalino porque disminuyen las fuerzas electrostáticas y en consecuencia se disminuye el punto de fusión (Alonso *et al.*, 2016).

Estos tipos de compuestos eutécticos tienen la capacidad de solvatar un amplio rango de metales de transición, incluyendo cloruros y óxidos. Su preparación es sencilla, ya que consiste en mezclar los dos componentes, generalmente con calor moderado. También, tienen un bajo costo de producción y son considerados amigables con el medio ambiente por ser compuestos biodegradables (Smith *et al.*, 2014).

Existen pocos estudios toxicológicos de los DES, pero se considera que la mayoría tienen una baja toxicidad, debido a que pueden formarse con una variedad de aminas y polioles, como la urea, el glicerol, el etileno y la fructosa los cuales ya tiene una baja toxicidad inherente. Radošević *et al.*, (2015) evaluaron la toxicidad *in vitro* de 3 DES en una línea celular humana (MCF-7) y en una de pez (CCO). Los DES se basaron en cloruro de colina que contenía glucosa, glicerol o ácido oxálico como HBD. Los datos indicaron que los DESs ChCl:glucosa y el ChCl:glicerol tienen baja toxicidad (EC₅₀ 410 mM para ambas líneas celulares), pero el DES ChCl:ácido oxálico mostró toxicidad moderada (EC₅₀ 1.64 mM y 4.19 mM para CCO y MCF-7, respectivamente). Por otro lado, Zhao *et al.* (2015) evaluaron la toxicidad en bacterias Gramnegativas (*E. coli* y *S. enteritidis*) y Gram-positivas (*S. aureus* y *L. Monocytogenes*) de los DES basados en ChCl, variando los HBD (urea, acetamina, etilenglicol, glicerol, 1,4-butanodiol trietilenglicol, xilitol, D-sorbitol, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido oxálico, ácido levulínico, ácido malónico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, xilosa, sucrosa, frucosa, glucosa y maltosa). Los resultados mostraron que los DESs son excelentes solventes que muestran baja toxicidad comparada con los solventes tradicionales y con otros ILs. Los únicos DESs que mostraron un halo de inhibición en las 4 cepas fueron los que tenían como HBD el ácido p-tolueno-sulfónico, ácido oxálico, ácido levulínico, ácido malónico, ácido cítrico

y el ácido tartárico. Esta toxicidad de los DESs con ácidos orgánicos se explica por el cambio de pH que altera la proliferación celular y el metabolismo.

Aunque los DES reducen el riesgo de contaminar el aire por su baja o nula volatilidad, éstos tienen una solubilidad significativa en el agua y consecuentemente puede esparcirse en aguas residuales y afectar grandes cantidades de área en términos de su toxicidad crónica, bioacumalarse o biomagnificarse si son persistentes y tienen baja biodegradabilidad en condiciones ambientales. Para disminuir el impacto ambiental de estos solventes, el manejo más efectivo es su retención en los procesos industriales para su reciclaje o reuso. Además, para el caso de los DES ácidos la regulación del pH es la mejor opción para reducir su toxicidad (Gotvajn y Kalčikova, 2017).

También, Zhao *et al.* (2015) evaluaron la biodegradabilidad de los 20 DESs, al inocularos en unos microorganismos de lago en un intervalo de tiempo. La biodegradabilidad de todos los DESs fue >69.3% después de 28 días. Los niveles de biodegradación fueron: DESs basados en aminas≈ DESs basados en azúcares > DESs basados en alcoholes > DESs basados en ácidos. La mayor biodegradabilidad fue del DESs formado por ChCl: 2urea con un 97.1%. Por lo tanto, los 20 DESs pueden considerarse "disolventes verdes" debido a su baja toxicidad y alta biodegradabilidad.

La posibilidad de recuperar los DESs cuando no son parte de la reacción también les agrega sustentabilidad para ser usados como disolventes (Mota-Morales *et al.*, 2018).

1.6.4 Polimerización por radicales libres en DESs con monómeros como HBD

Mota-Morales *et al.* (2011) fueron los pioneros en utilizar DESs para la polimerización frontal (PF) de una mezcla de 1 ChCl : 1.6 ácido acrílico o 2 ChCl : 1 ácido metacrílico. La mezcla de estos compuestos en diferentes relaciones molares permitió la preparación de DES con diferentes viscosidades. Observaron que al controlar la temperatura y la velocidad de la polimerización se incrementaban las conversiones de los monómeros en la reacción. También, demostraron que se puede usar una variedad importante de monómeros como componentes de los DESs. También, Mota-Morales *et al.* (2013a) polimerizaron un DES con ChCl, por medio del uso de ácido acrílico como HBD y ellos reemplazaron el ChCl con el compuesto anestésico hidrocloruro de lidocaína (LidHCl) como sal de amonio cuaternaria. Los resultados más interesantes fueron que la temperatura utilizada fue sumamente baja (80°C a 120°C) para algunas

polimerizaciones de ácido acrílico y ácido metacrílico, en comparación con una polimerización frontal convencional (por arriba de 200 °C), y se alcanzaron conversiones cuantitativas (100 %), lo que evitan la liberación de sub-productos que eventualmente pueden ser tóxicos. Por otro lado, las temperaturas bajas durante la polimerización son benéficas para la conversión del ácido acrílico. La liberación de LidHCl fue sostenida y controlada durante el tiempo de análisis en una solución amortiguadora con pH = 7. La posibilidad de utilizar temperaturas bajas y de obtener conversiones cuantitativas también es importante para la aplicación de estos polímeros en la liberación de fármacos, ya que éstos necesitan excipientes que los protejan de la degradación.

Sánchez-Leija *et al.* (2013) estudiaron de forma *in vitro* la liberación de un DES polimerizado que contenía LidHCl, y como HBD ellos utilizaron ácido acrílico y ácido metacrílico con diferentes grados de entrecruzamiento. Encontraron que el LidHCl se integró homogéneamente en el polímero. Los experimentos *in vitro* mostraron que la liberación prolongada del fármaco respondía a cambios en el pH, fuerza iónica y la solubilidad del fármaco en el medio.

También se han preparado nanocompósitos con nanotubos de carbono en disolventes DESs basados en mezclas de ácido acrílico y ChCl (Mota-Morales *et al.*, 2013b) después de que Gutiérrez *et al.* (2010) reportaran que una mezcla de 2 etilenglicol : 1 ChCl tiene la capacidad de dispersar nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT).

1.6.5 Emulsiones altamente concentradas

Una emulsión consiste en una dispersión termodinámica inestable de gotas en una fase continua en un segundo líquido el cual es inmiscible en el primero. Estos líquidos pueden estar estables por la adición de estabilizadores, surfactantes, polímeros o partículas sólidas, las cuales se adsorben en la superficie de las gotas. Para emulsiones que contienen agua y aceite como líquidos inmiscibles, se conocen como aceite-en-agua (o/w) y agua-en-aceite (w/o) (Dunstan *et al.*, 2012).

Tambipen, los DESs se han usado para preparar y posteriormente polimerizar emulsiones altamente concentradas (HIPE por sus siglas en inglés *high internal phase emulsion*).

Una emulsión HIPE contiene en una fracción de volumen de la fase interna mayor al 74% y por lo tanto, es altamente viscosa. El primer criterio para la formación de los HIPEs es la presencia de dos líquidos inmiscibles, que generalmente son líquidos hidrófobos. Usualmente, la formación de los HIPEs se realiza por la adición de la fase interna a una solución de surfactante en la fase externa con agitación constante. Cuando se centrífuga una emulsión, las gotas son forzadas a estar en contacto con otras y se produce una deformación de éstas en forma de poliedros (**Figura 3**). La estabilidad de los HIPEs depende de la naturaleza y la concentración del surfactante, la naturaleza y viscosidad de cada fase líquida, la temperatura del sistema, el tamaño promedio de la gota y la tensión superficial entre las fases.

Una de las muchas aplicaciones de los HIPEs en la ciencia de materiales es su uso como plantillas para crear estructuras altamente porosas. Estos materiales se pueden producir si la fase interna de la emulsión se prepara con una fase continua que contiene una o más especies monoméricas. Con la subsecuente eliminación de la fase interna, se producen estos materiales altamente porosos (PoliHIPEs) (Cameron y Sherrington, 1996; Silverstein, 2014).



Figura 3. Deformación de las gotas en una HIPE. (a) Dodecahedron pentagonal regular, (b) tetrakaihedron y c) β -tetrakaidecahedron (Cameron & Sherrington, 1996).

Los PoliHIPEs tienen morfologías complejas, poseen cavidades esféricas conocidas como huecos y ventanas que interconectan estos huecos (Cameron, 2005). El tamaño del espacio total vacío dentro de los PoliHIPEs es relativamente grande como consecuencia de la porosidad e interconectividad del material, que resulta en un área superficial baja. Afortunadamente, hay métodos para incrementar el área superficial de los PoliHIPEs. Schwab et al., (2009) reportaron la síntesis de poliHIPEs de poli (divinilbenceno, DVB) con una distribución bimodal de poro (**Figura 4**) y un área superficial grande (1210 m²g⁻¹). Después de la polimerización de la fase continua, se realizó una extracción Soxhlet para eliminar los residuos que pudieron haberse quedado dentro de la estructura porosa del poliHIPE. El tiempo de la extracción afectó

el área superficial y las propiedades mecánicas de éste. La eliminación de los residuos del monómero, el surfactante y el solvente incrementó el área superficial del poliHIPE.



Figura 4. Micrografía SEM de un poliHIPE de poly(DVB) (Schwab et al., 2009).

Bajo ciertas condiciones se han realizado polimerizaciones de HIPEs en fase no acuosas. Barbetta *et al.* (2000) preparó poliHIPEs de cloruro de 4-vinilbencilo y divinilbenceno con un tamaño de poro pequeño ≈10 µm. Este fenómeno se debe a la adsorción de cloruro de 4-vinilbencilo en la interfase, lo que provoca la disminución de la tensión interfacial y permite una emulsión altamente estable con tamaño de gota pequeño y por lo tanto la producción de una espuma con un tamaño de poro pequeño.

Carranza *et al.* (2014) propusieron a los DES, como una alternativa para ser utilizados como la fase interna en la síntesis no acuosa de los poliHIPEs. La polimerización de los HIPEs se realizó con monómeros como el ácido metacrílico como fase continua y como fase interna no acuosa un DES compuesto de 1 ChCl : 2 urea. Los poliHIPEs resultantes mostraron una macroporosidad interconectada con tamaños de poro < 20 µm. La conversión del monómero metacrilato de metilo (MMA) fue de 81 al 99%, con una estabilidad térmica alrededor de 220 °C y una porosidad consistente con el tamaño de gota y el diámetro de poro (**Figura 5**). Además, se logró recuperar del 82% al 95% del DES utilizado como fase interna, demostrando la posible capacidad de reciclaje del DES.



Figura 5. A) Imagen confocal de una HIPE de MMA B) Microscopía SEM de un poliHIPE de MMA (Carranza *et al.,* 2014).

Pérez-García *et al.* (2015) también reportaron la síntesis de un poliHIPE usando un DES. La fase continua consistió en una mezcla de 10 estireno: 1 divilbenceno. Con el fin de obtener diferentes viscosidades, prepararon la fase interna luego de combinar ChCl con urea, glicerol y etilenglicol con una relación molar 1:2. Después de la polimerización realizaron una extracción Soxhlet con metanol por 12 h. Todos los poliHIPEs tuvieron conversiones entre 91 y 96% y ésta no se vio afectada por el tipo de fase interna. La cantidad de surfactante influyó en el tamaño de la gota, la viscosidad de los HIPEs y en el diámetro de los poros. Aunque la morfología del material fue altamente porosa e interconectada, el área superficial fue baja.

La preparación de poliHIPEs al usar DES provee la ventaja de utilizar un alto rango de temperaturas. La polimerización de los HIPES se puede lograr a bajo costo y sin condiciones especiales.

1.6.6 PoliHIPES tipo pickering

Debido a que los surfactantes son contaminantes que suelen removerse después de la polimerización del HIPE, la remoción del surfactante como parte de la producción de poliHIPEs puede ser costosa. Además, el surfactante residual puede afectar las propiedades del poliHIPE. Por lo tanto, reemplazar los surfactantes utilizados puede reducir los costos en la síntesis de los poliHIPEs (Silverstein, 2014). Recientemente, se ha propuesto la introducción de materiales nano y micro en la arquitectura de los poliHIPEs, al proveer paredes funcionalizadas. Estas emulsiones llamadas *pickering* eliminan la necesidad de usar surfactantes. Son notablemente estables contra la coalescencia, debido a la tendencia de las

nanopartículas de adsorberse a la interfase de agua en el aceite formando barreras más densas. Los nanomateriales que se agregan a las emulsiones actúan como estabilizadores durante la polimerización de las HIPEs, así como soporte estructural después de la polimerización, ofreciendo una funcionalización selectiva (Akay, 2004).

Carranza *et al.* (2016) reportaron la síntesis de los poliHIPEs funcionalizados con nanotubos de carbono multicapa (MWCNT). La formación y polimerización de los HIPES con ácido metacrílico y estireno fue posible a través de su estabilización con nanotubos de carbono dopados con nitrógeno (CNx) y una mezcla de surfactantes. Ellos utilizaron un DES de 1 ChCl : 2Urea como fase interna en la emulsión HIPE. Los PoliHIPEs funcionalizados con CNx mostraron un incremento en la hidrofobicidad y en la adsorción de combustibles (biodisel/diesel/gasolina/hexano). Dentro del esudio se mostró que el derivado de estireno-divinilbenceno fue el que tuvo la mayor capacidad de adsorción.

Con respecto al uso de HA para preparar biomateriales usando HIPEs *pickering*, Akay *et al.* (2004) mostraron que en la superficie de los poliHIPEs de estireno con HA se presenta una mineralización y una acumulación de la matriz extracelular, después de haber sido cultivado *in vitro* con osteoblastos. Wang *et al.* (2016) también reportaron la síntesis de poliHIPEs con HA. Ellos caracterizaron las propiedades mecánicas y estructurales de los poliHIPEs con diferentes cantidades de HA. La rigidez y la dureza del material se incrementó sin perder la estructura micro-porosa del poliHIPE. También, observaron un incremento en la viabilidad celular de osteoblastos, debido a la adhesión inicial de células al material como consecuencia de la disminución en su hidrofobicidad. Estos resultados presentan la posibilidad de utilizar estas estructuras como andamios para la regeneración del tejido óseo.

Recientemente, Carranza *et al.* (2017) reportaron la estabilización de poliHIPEs con nano-hidroxiapatita (NHA) <200nm. La fase interna comprendió un DES compuesto de 1 ChCl : 2 urea y la fase consistió en el monómero metil metacrilato. Debido a la alta polaridad y viscosidad de la fase interna, se logró una interacción eficiente de NHA/surfactante con la interfase del HIPE. También, reportaron un ensayo preliminar de biocompatibilidad *in vivo* de los poliHIPEs. Aunque observaron una inflamación aguda durante la primera semana después de la implantación del material en el músculo de la rata, el resultado fue considerablemente menor comparada con la inflamación causada por una gasa estéril. Después de 90 días no observaron reabsorción del poliHIPE en el tejido o su destrucción por el sistema inmune y a nivel celular una respuesta clásica de "cuerpo extraño".

1.7 Justificación

Los daños en huesos se pueden originar por un accidente, una enfermedad o naturalmente debido al deterioro asociado a la vejez. En los casos en que la reparación del hueso naturalmente presenta dificultades, el uso de injertos óseos se convierte en la solución más adecuada. Debido al número de procedimientos de injerto óseos anuales (en 2001, tan solo en el país se requirieron aproximadamente 20 mil injertos de hueso para satisfacer las necesidades en cirugias ortopédicas), el incremento en el número de pacientes que son sometidos a cirugías ortopédicas; así como los problemas asociados a los injertos como son: el rechazo y el riesgo de transferencia de enfermedades; se ha evidenciado la necesidad de buscar nuevos materiales que favorezcan la regeneración ósea (Luna, 2003).

El sustituto ideal deberá tener una estructura tridimensional, ser biocompatible, bio-reabsorbible, osteoconductivo, osteoinductivo, fácil de implantar y económico. Hasta ahora los mayores logros los han aportado la ciencia de materiales y la ingeniería de tejidos, que en conjunto con la nanotecnología pueden desarrollar nanocompositos que imitan la estructura natural del hueso, para obtener nuevos y mejores sustitutos que los que se encuentran actualmente en el mercado.

De acuerdo a las ventajas que tienen los DESs para ser utilizados como fase interna en los HIPEs, de la facilidad para utilizar estas HIPEs como plantillas para obtener materiales porosos e interconectados y de la respuesta celular inducida por las NHA, en este proyecto se planea diseñar y desarrollar andamios poliméricos mediante el uso de HIPEs en medios no acuosos, que contengan NHA, de modo que se promuevan el crecimiento celular para su aplicación en el cultivo en la ingeniería del tejido óseo.

1.8 Hipótesis

La incorporación de NHA en un poliHIPE permitirá obtener un nanocomposito bioactivo que incremente la proliferación y diferenciación osteoblástica en comparación con los poliHIPEs sin NHA.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Desarrollar un nanocomposito bioactivo mediante la incorporación de NHA en una matriz polimérica.

1.9.2. Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar la mezcla eutéctica (DES).
- Sintetizar y caracterizar las emulsiones altamente concentradas (HIPEs).
- Incorporar las NHA en las emulsiones HIPEs y caracterizar la emulsión compuesta.
- Polimerizar las emulsiones HIPEs y caracterizar estructuralmente los monolitos poliméricos (poliHIPEs).
- Caracterizar las propiedades mecánicas de los poliHIPEs.
- Evaluar la respuesta celular de los poliHIPEs mediante ensayos in vitro.

2.1 Síntesis del DES

<u>Materiales:</u> El cloruro de colina (Sigma Aldrich ≥98.0%) y la urea (Sigma Aldrich ≥99%) se utilizaron sin previa purificación.



Figura 6. Estructura de los componentes del DES.

<u>Procedimiento:</u> En un frasco, se secó el cloruro de colina (ChCl) en un horno de convección a 90°C y se mezcló con urea como HBD con una relación molar 1:2 respectivamente. El frasco se colocó en un horno a 60°C hasta obtener un líquido viscoso, homogéneo y transparente **Figura 7**. El DES se almacenó en el frasco cerrado a temperatura ambiente.



Figura 7. Componentes del DES (1 ChCl : 2urea).

2.2 Caracterización del DES

2.2.1 Análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Para determinar las interacciones moleculares presentes en el DES, especialmente las debidas a enlaces de hidrógeno (EH) entre los diferentes grupos del ChCl y la urea, se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del DES y del ChCl.

La espectroscopía infrarroja es el estudio de la interacción de la luz infrarroja con la materia. Cuando una molécula absorbe esta radiación infrarroja sus enlaces químicos vibran, éstos pueden estirarse, contraerse o doblarse. En el espectro infrarrojo la vibración de una molécula resulta en una señal representada en un pico localizado en el número de onda (energía) donde la luz fue absorbida. Estas señales son el resultado de diferentes modos de vibración de grupo funcionales específicos, debido a que éstos tienden a absorber la radiación infrarroja en el mismo rango independientemente de la estructura del resto de la molécula. Esto significa que hay una correlación entre el número de onda a la que la molécula absorbe la radiación infrarroja y sus grupos funcionales (Smith, 1999). Por lo tanto, la espectroscopía infrarroja es una técnica sensible para analizar las interacciones que existen entre los componentes que conforman el DES.

<u>Procedimiento</u>: Se realizó el FTIR del DES líquido con el aparato Spectrum GX de Perkin Elmer en el modo de reflectancia totalmente atenuada (ATR, por sus siglas en inglés *Attenuated Total Reflection*), para cada espectro se realizaron y promediaron 24 barridos con 4 cm⁻¹ de resolución.

2.2.2 Análisis H¹ NMR

Para estudiar la formación del DES e indicar la ausencia de reacción química entre el ChCl y la urea, se realizó un espectro de H¹NMR del DES puro. La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) se basa en la absorción de la energía (radio-frecuencia) de una sustancia puesta en un campo magnético. Sí la frecuencia es apropiada, entonces los núcleos de la molécula pueden absorber la energía. La frecuencia depende del tipo de núcleo y del ambiente químico de éste. Debido a que el H¹ actúa como un magneto (espin nuclear), éste puede girar de una orientación (estado de energía) a otra cuando el núcleo está situado en el campo magnético. La absorción de la energía del espin causa transiciones de un estado de alta energía a uno de baja energía y

viceversa; esta energía produce un voltaje que se puede medir. Esta técnica es muy precisa debido a que los núcleos del mismo tipo pueden alcanzar la condición de resonancia a diferentes frecuencias, porque la frecuencia en la que un núcleo en particular logra resonancia depende del efecto pantalla (*shielding*) que refleja el entorno electrónico del núcleo (James, 1998).

<u>Procedimiento</u>: El DES puro 1 ChCl : 2 Urea se colocó dentro de un capilar, el cual se selló por ambos lados y se mantuvo a 69°C. Posteriormente el capilar conteniendo el DES puro se colocó dentro de un tubo para NMR que contenía CDCl₃ (cloroformo deuterado) como referencia externa, este último se usó para ubicar las señales del DES en el espectro. El espectro de H¹NMR del DES se realizó en un espectrómetro Bruker spectrometer DRX-500 (500 MHz). Los desplazamientos químicos son determinados respecto a un compuesto de referencia, el tetrametilsilano (TMS, (CH₃)₄Si) que se define como 0.00 δ (ppm).

2.2.3 Análisis DSC

La estabilidad térmica es una de las propiedades que es necesaria conocer porque indica los límites máximos en que un disolvente puede usarse. Una característica de los DESs es que su temperatura de fusión es considerablemente menor que la de sus constituyentes puros. La temperatura de fusión del cloruro de colina es de 302°C y de la urea 133°C. Abbot *et al.* (2003) describió que un DES con relación 1 ChCl : 2 Urea tenía un punto de congelamiento (*freezing point*) de 12°C. La manera más precisa de ver el comportamiento térmico de un DES es mediante la técnica calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimeter*). Esta técnica mide cómo la capacidad calorífica (Cp) del material cambia respecto a la temperatura. Una porción de la muestra es sometida a ciclos de calentamiento-enfriamiento y los cambios en su Cp son rastreados como cambios en el flujo de calor (Perkin Elmer,2014).

<u>Procedimiento:</u> Una porción del DES (ca. 10 mg) se colocó en el porta-muestras de aluminio y se selló herméticamente. La muestra después se enfrió a -60°C y se calentó a 125°C con una rapidez de 10°C/min y se midió en un calorímetro diferencial de barrido, DSC 2920, TA Instruments.

2.2.4 Determinación de la viscosidad

La estabilidad y el tamaño de las gotas de la emulsión se pueden ver afectados por la viscosidad de la fase interna que en el caso de este trabajo es un DES (Carranza *et al.* 2016). La viscosidad en el DES depende de los enlaces de hidrógeno entre el ChCl y la urea, por lo tanto, un incremento en la temperatura disminuye estas interacciones y en consecuencia disminuye la viscosidad (Majill *et al.* 2015). Para realizar la medición de la viscosidad, la muestra se carga entre dos placas en un reómetro, se ejerce una tensión de cizallamiento rotativo en el material y se mide la tensión resultante. Estos resultados son una representación de la relación temperatura-viscosidad utilizando la Ley de Newton, dónde; el esfuerzo de corte = (viscosidad) (tasa de corte) (Malvern-Panalytical, 2010).

<u>Procedimiento:</u> La viscosidad del DES se determinó con la medición del esfuerzo de corte en un reómetro de esfuerzo (AR2000ex, TA Instruments), el análisis se realizó por triplicado. Las viscosidades se adquirieron en un rango de velocidad de estrés de 0.1 a 1000 s⁻¹ con una temperatura controlada en intervalos de 10°C en un rango de 20°C a 90°C a través de un plato Peltier con una exactitud de +/- 0.1°C.

2.3 Preparación de la emulsión

<u>Materiales:</u> Todos los reactivos fueron comprados en Sigma-Aldrich y se usaron sin previa purificación. Metil-metacrilato (MMA) (99%), etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) (98%), nano hidxoxiapatita (NHA) en polvo (tamaño de partícula < 200nm, ≥97%), urea (99%) y cloruro de colina (98%). El surfactante Cithrol^(R) (PEG-30 dipolihidroxiestearato) fue donado por la empresa Croda, Ltd.

<u>Procedimiento:</u> 1.- La fase continua (20 %vol del total de la emulsión) consiste en una mezcla de monómero (MMA) y entrecruzante (EDGMA) en una relación molar 2:1 respectivamente. 2.- A la fase continua se le agregó el surfactante, Cithrol[™]. La cantidad de surfactante utilizado fue de 8.8 %P (peso) respecto al peso total de la emulsión. Se agitó en un vórtex (Vórtex Genie 2; max rpm, 3200 rpm) por 20 min para asegurar una mezcla homogénea. 3.- Para preparar la fase interna (80 %vol), se preparó un DES con una proporción molar 2:1 de Urea : ChCl y se colocó en un horno a 60°C hasta obtener un líquido viscoso y homogéneo. 4.- Los HIPEs se prepararon mezclando las 2 fases en un vial y se agitaron a 3200 rpm con un vórtex por 10 min, hasta obtener una emulsión homogénea. 5.- Para las emulsiones *pickering*,
se usó 1 %P de NHA respecto a la fase continua y se añadió a la mezcla (monómero/entrecruzante/ surfactante).



Figura 8. Estructura de los reactivos en la fase continua: monómeros (MMA, LA, SMA), entrecruzantes (EDGMA, BDA), surfactante (Cithrol) e iniciador (AIBN).



Figura 9. a) HIPE de MMA b) HIPE de MMA con NHA

2.4 Caracterización de la emulsión

Para distinguir el lugar de cada fase en la emulsión, la fase continua (1 MMA : 2 EDGMA) se marcó con el colorante rodamina Rh6G.

<u>Materiales</u>: El marcador fluorescente rodamina 6G (Rh6G-252433) se compró en Sigma Aldrich (99%). Éste presenta fluorescencia entre 570 a 660 nm con un máximo a 590nm.



Figura 10. Estructura de la rodamina 6G.

<u>Procedimiento:</u> A la fase continua (monómero, entrecruzante y surfactante) de la emulsión se le agregó 0.004 % molar del marcador fluorescente rodamina. La emulsión se preparó mezclando la fase continua (20 %vol) con la fase interna (80%Vol) (1 ChCl : 2 Urea) en un vial y se agitó a 3200 rpm con un vórtex por

10 min. Para las emulsiones *pickering* se añadió el 1 %P de NHA respecto a la fase continua. Se colocó una parte de la emulsión entre un portaobjetos/cubreobjetos y se visualizó en un microscopio confocal invertido de barrido láser ZEISS LSM880/Axion Observer 7 con un láser de 514 nm. Se ocupó el software ZEN 2.3 SP1 para visualizar las imágenes. La estabilidad de la emulsión se estudió por 2 h bajo observación continua en el microscopio. Los tamaños de las gotas en la emulsión se midieron con el software ImageJ.



Figura 11. Emulsiones HIPE marcadas con Rh6G a) Mezcla EDGMA:2MMA con Rh6G (0.0004 %M), b) HIPE de MMA y c) HIPE de MMA-NHA

2.5 Polimerización de la emulsión

La síntesis y polimerización de la emulsión se realizó de acuerdo a los trabajos realizados por Carranza *et al.* (2017).

La fase continua consistió en una mezcla 2:1 de monómero y entrecruzante, respectivamente. Los monómeros utilizados fueron MMA (metil-metacrilato), SMA (estearil-metacrilato) y LA (lauril acrilato), como entrecruzantes se utilizó EDGMA (etilenglicol dimetacrilato) para metacrilatos y BDA (1, 4-butanodiol diacrilato) para acrilatos (**Figura 8**).

<u>Procedimiento:</u> 1.- Los HIPEs se prepararon mezclando la fase continua y la fase interna (DES, 1 ChCl : 2 urea) en un vial con la ayuda de un vórtex a 3200 rpm por 10 min, hasta obtener una emulsión homogénea. La fase continua se agregó a la fase continua (DES 1 ChCl : 2 urea) en una sola dosificación. También se agregó a la fase continua el 2 mol % del iniciador 2,2'–Azobis (2 metilpropionitrilo) (AIBN) respecto al total de grupos reactivos C=C en la mezcla 2:1 monómero-entrecruzante. 2.- La polimerización de las emulsiones (poliHIPEs) se llevó a cabo en un horno de convección a 60°C por 24 h. 3.- Se removió la fase interna y el surfactante por medio de extracción Soxhlet usando etanol por 24h. 4.- Los poliHIPEs se secaron a 60°C hasta alcanzar un peso constante y la conversión de los PoliHIPEs se determinó por gravimetría en tres muestras como mínimo.



Figura 12. a) HIPE y b) PoliHIPE.

2.6 Caracterización de los poliHIPEs

La estructura y el tamaño de poro de los poliHIPEs se observaron con un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*) posterior a su recubrimiento con una película delgada de oro, aplicada por erosión catódica. Se utilizó la técnica de difracción de rayos X (XRD) y microtomografía de rayos X (µ-CT) para visualizar la estructura cristalina de la NHA en el poliHIPE pMMA-NHA. El esfuerzo de deformación y el módulo de Young de los poliHIPEs se evaluaron con una prueba de compresión sobre monolitos con geometría cilíndrica.

2.6.1 Microscopio electrónico de barrido

Se fracturó un monolito (poliHIPE) y una muestra se montó en un portamuestras. A la muestra se le hizo un recubrimiento por medio de erosión catódica (*sputtering*) de una película delgada de oro para volverla conductora, posteriormente se dejó secar en vacío. La obtención de imágenes por SEM de los poliHIPEs se realizaron con un microscopio JEOL JSM-60 60 LV, a una aceleración de 10, 15 o 20 kV. El tamaño de poro en los PoliHIPEs se midió con el software Image J.

2.6.2 Microtomografía de rayos X

La muestra MMA-NHA con dimensiones 1.5 x 1.5 x 1.7 mm, fue montada en un alfiler utilizando una resina epóxica. Para el análisis se utilizó el microtomógrafo Xradia Zeiss 510 Versa, con un voltaje de 40 Kv, con potencia de 3W y a una resolución de 448.3 nm/pixel. Para eliminar el ruido de los bordes de la muestra se cortó la imagen en un cubo, se aplicó el filtro *Anisotropic Diffusion* para mejorar la imagen y eliminar el ruido de la misma muestra. Posteriormente se segmentó la fase porosa de la fase con NHA a través de algoritmos para el procesamiento de imágenes y procesos morfológicos usando los módulos de Avizo 9.5 *erosion, dilation* y *fill holes*. Finalmente, se realizó un análisis de distribución de tamaños de los poros.

2.6.3 Difracción de rayos X

Se tomó una porción de los monolitos pMMA y pMMA-NHA y se molió con un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. El análisis cualitativo de los polvos se realizó con un difractómetro Rigaku Ultima IV con un tubo de difracción de cobre con Λ = 1.54 Å. La muestra se midió en el rango de 20 de 5 a 80°C, con una velocidad de 10° por minuto. Se utilizó un detector ultra-rápido D/TEX.

2.6.4 Pruebas mecánicas

Las propiedades mecánicas de los monolitos se evaluaron con un equipo Zwick/Roell, modelo Z005, utilizando una celda de 5 kN con una velocidad de 1 mm/min. Las condiciones de análisis fueron 32% de humedad con 26.2°C de temperatura. Los poliHIPEs se comprimieron hasta su ruptura y su módulo elástico se determinó con la pendiente obtenida del rango lineal de la gráfica de tensión-deformación (**Figura 13**).



Figura 13. Gráfica tensión-deformación de pMMA-NHA.

2.7 Estudios de biocompatibilidad

La biocompatibilidad de los andamios se evaluó mediante ensayos de viabilidad y proliferación celular en una línea celular de fibroblastos y otra de osteoblastos. También se evaluó la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo, la producción de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) debido a que ésta es un indicador del proceso de diferenciación celular de los osteoblastos hacia osteocitos. Y por último se evaluó la hemocompatibilidad de los poliHIPEs mediante una prueba de hemólisis en la que se determinó si la integridad de la membrana en eritrocitos puestos en contacto con los PoliHIPEs se conserva.

2.7.1 Materiales:

• Cultivo celular de fibroblastos

La línea celular HFF-1 de fibroblastos humanos (ATCC SCRC-1041) fueron cultivados en medio DMEM (por sus siglas en inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*) al 15%, 1% de L-glutamina, con 1% de estreptomicina/ penicilina, (2g/L) bicarbonato de sodio ajustado a un pH de 7.4, bajo condiciones de 5% de CO₂ a 37°C.

• Cultivo celular de osteoblastos

Los osteoblastos de ratón MC3T3-E1 subclina E4 (ATCC CRL-2593), fueron cultivados en un medio MEM- alpha (por sus siglas en inglés *Minimum Essential Medium Alpha Medium*) que contiene 1% de L-glutamina, 10% de FBS, 1% de antibiótico/antimicótico, y 2.2 g/L de bicarbonato de sodio ajustado a un pH de 7.2-7.5, bajo condiciones de 5% de CO₂ a 37°C.

- El reactivo 5(6)-CFDA- SE, Cat. V12883 (Invitrogen), se mantuvo en congelamiento (-20 °C) y se protegió de la luz hasta su uso.
- Solución amortiguadora fosfato salino 1 X, estéril, con un pH= 7.4 (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*)
- Solución tripsina/EDTA 1 X, almacenar a -20°C hasta su uso.
- El reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) M5655-500MG- se compró en Sigma Aldrich, se mantuvo a 4°C y se protegió de la luz hasta su uso.
- El reactivo C12-resazurina Ref. L34951, (Life Tecnhnologies), se mantuvo en refrigeración (4°C) y se protegió de la luz.
- El reactivo MitoSox con Ref M36008 se compró en Invitrogen. Se mantuvo en congelamiento (-5 a 30°C) y se protegió de la luz.
- DMSO (Dimetilsulfóxido) ≥99%.
- Solución BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina, sal) y NBT (nitroazul de tetrazolio), preparar la solución antes de su uso.
- Solución 150mM de NaCl: se pesó 2.1915g de NaCl en 250mL de agua mili-Q.
- Solución 20% Triton X: se mezcló 5mL de Triton X-100 en 20mL de agua mili-Q, se agitó y se sonicó para disolver. Se dejó a temperatura ambiente por una noche antes de usar.
- Para todos los experimentos los poliHIPES (pLA, pLA-NHA, pSMA, pSMA-NHA, pMMA y pMMA-NHA) fueron previamente esterilizados por 30min con luz UV.

2.7.2 Determinación de la proliferación celular en fibroblastos HFF-1 mediante el ensayo de reducción de CFDA-SE

El CFDA-SE es una molécula que es permeable a la célula, una vez que se encuentra en el citoplasma, los grupos acetatos del CFDA-SE son hidrolizados por esterasas intracelulares a un compuesto que reacciona

con aminas, éste forma conjugados fluorescentes que son retenidos en el citoplasma celular. De esta manera, las células viables tendrán una elevada actividad hidrolítica mediada por las esterasas incrementando así la cantidad del compuesto fluorescente. El exceso no conjugado y/o sub-productos difunden pasivamente al medio extracelular donde pueden ser lavados y desechados. Este reactivo tiene una máxima absorción y emisión de 492/517nm (Invitrogen, 2006).

<u>Cultivo de las células en los andamios</u>: 1.- Los PoliHIPEs fueron hidratados por 10 min con medio DMEM en una placa de cultivo de 12 pozos, cada pozo contenía 500 μ L de medio DMEM._2.- Una vez hidratados, los PoliHIPEs fueron inoculados con una concentración de 150,000 células por pozo en un volumen final de 500 μ L de medio DMEM y se incubaron por 96 h a 37°C y 5% de CO₂.

<u>Preparación del reactivo CFDA:</u> 1.- Se preparó una solución stock 10 mM de CFDA-SE inmediatamente antes de utilizar, disolviendo 1 vial del reactivo (componente A) en 90 μ L de DMSO (Componente B). 2.-Se diluyó la solución en PBS 1X para llegar a la concentración (0.5–25 μ M) que fue la solución de trabajo.

<u>Tripsinización de las células:</u> 1.- Se retiró el medio de cultivo de los pozos y se separó el poliHIPE en un tubo (A). 2.- Se lavó el pozo con 100 μ L de PBS 1X y este volumen se depositó en un tubo de 1.5mL (B)._3.- Se agregaron 100 μ L de tripsina/EDTA en cada pozo y la placa se incubó por 3 min a 37°C y 5% de CO₂._4.- Se agregó tripsina en cada tubo A y se incubó por 6min a 37°C y 5% de CO₂. 5.- Las células del tubo A y B se centrifugaron a 1200 rpm por 5min. 6.- El pellet obtenido de la centrifugación del paso anterior se resuspendió en 500 μ L de PBS 1X y se incubó a 37°C y 5% de CO₂. 7.- Se agregó la cantidad de CFDA-SE necesaria para alcanzar una concentración (0.5- 25 μ M) y las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 1.5 h.

Lavado del exceso de CFDA: 1.- Se centrifugaron las células del paso anterior (7) a 1200 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS 1X.

<u>Lectura en citómetro de flujo</u>: 1.- Se leyeron las muestras y los controles en el citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher) con los siguientes parámetros FSC= 470, SSC=425, BL1, Ex/Em =492/517 nm. Se capturaron un mínimo de 10,000 eventos por muestra.

2.7.3 Determinación de la viabilidad celular en fibroblastos HFF-1

Para determinar la viabilidad celular, se realizó un ensayo colorimétrico por reducción del reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) descrito por Mosmann (1983). El MTT es un reactivo de color amarillo, que es capaz de permear la membrana celular por las células metabólicamente activas, mediante la actividad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Los cristales de formazán producidos intracelularmente son de color violeta e insolubles en agua por lo que se deben de solubilizar para cuantificarse por densidad óptica a 570 nm. La reducción del MTT depende de oxidoreductasas que requieren NAD(P)H, por lo tanto, es una medida del metabolismo y viabilidad celular, ya que las células con una alta tasa de división tienen una mayor velocidad en la reducción del MTT. De esta forma, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (ATTC, 2011).

<u>Cultivo de las células en los andamios</u>: 1.- En una placa de cultivo de 96 pozos los poliHIPEs fueron hidratados por 10 min con 100 μ L de medio DMEM. 2.- Se inocularon los poliHIPEs con 12,500 células HFF-1 por pozo y la placa se incubó por 96 h a 37 °C y 5% de CO₂.

<u>Preparación del reactivo MTT:</u> 1.- Se preparó una solución stock 12 mM de MTT añadiendo 15 mg de MTT a 3 mL de PBS 1X. Se agitó con un vórtex hasta disolver el MTT, se alicuotó en tubos de 1.5 mL y se guardó a 4°C, protegiéndolo de la luz.

<u>Tripsinización de las células:</u> 1.- Se retiró el medio DMEM de los pozos y se separó el poliHIPE en un tubo de 1.5 mL (A). 2.- Se agregaron 100 μ L de tripsina en cada tubo A y éstos se incubaron por 6min a 37°C y 5% de CO₂. 3.- Se lavó el pozo con 100 μ L de PBS 1X y éste se depositó en un tubo de 1.5 mL (B). 4.-Se agregaron 100 μ L de tripsina en cada pozo y la placa se incubó por 3 min a 37°C y 5% de CO₂. 5. Las células despegadas del pozo se depositaron en el tubo B. 6.- Las células del tubo A y B se centrifugaron a 1200 rpm por 5min.

<u>Incubación de las células con el MTT</u>: 1.- El pellet obtenido de la centrifugación del paso anterior (6), se resuspendió en 30 µL de MTT + 270 µL de medio DMEM. 2.- Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 4 h. La placa se cubrió de la luz debido a que el MTT es sensible a ésta. 3.- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se disolvieron los cristales de formazán con 300 µL de isopropanol y se resuspendieron con un vórtex. 4.- En un lector de placas de ELISA, se medió la densidad óptica a 570 nm para el MTT y 690 nm para el medio de cultivo (este valor es usado como blanco). 5.- La densidad óptica

del formazán en el control (células no tratadas) se tomó como el 100% de viabilidad celular. 6.- Se graficaron los resultados del porcentaje de viabilidad celular, calculándolo con la siguiente fórmula:

Viabilidad celular (%) = (Abs
$$_{570-690 \text{ nm}}$$
 células) (100%) / (Abs $_{590-670 \text{ nm}}$ células control) (2)

2.7.4 Determinación de la proliferación celular en osteoblastos de ratón mediante el ensayo de reducción de la rezasurina

El colorante resazurina es un indicador rédox para determinar la viabilidad celular a través de la actividad metabólica de las células. La resazurina, es un compuesto de color azul no fluorescente y no tóxico que es permeable a la célula, una vez en el citoplasma se reduce a resorufina un compuesto de color rojo y altamente fluorescente que se puede cuantificar midiendo su fluorescencia o absorbancia. El crecimiento celular crea un ambiente reducido, mientras que su inhibición mantiene un entorno oxidado. Por lo tanto, la cantidad de resazurina reducida es proporcional al número de células viables (BIOSOURCE, 2008).

<u>Cultivo de osteoblastos de ratón MC3T3-E1 en los poliHIPEs</u>: 1.- En una placa de cultivo de 96 pozos los poliHIPEs fueron hidratados por 10 min con medio, cada pozo (1) contenía 100 μL de medio DMEM. 2.-Los poliHIPEs se inocularon con 12,500 osteoblastos por pozo y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. 3.- A las 24h se retiró el medio de cultivo de los pozos, se separó el poliHIPE y se colocó en otro pozo (2) con 100μL de medio de crecimiento. Se dejaron incubando las células con el poliHIPE por 24 h más a 37°C y 5% CO₂.

<u>Incubación de las células con la resazurina:</u> 1.- Las células que quedaron en el pozo (1) se les agregó medio de crecimiento con 10% (v/v) de resazurina (0.02%). las células se incubaron por 4 h a 37°C y 5% CO₂. Estas células se consideraron como las que no se adhirieron al material (t=0). 2.- Las células en el pozo (2) se les retiró el medio de cultivo y se les agregó medio nuevo con 10% (v/v) de resazurina. Las células se incubaron por 4 h a 37°C y 5% CO₂. Se tomaron 150 μ L de resorufina y se colocaron en otra placa para su lectura.

<u>Lectura en espectrofotómetro</u>: 1.- Se monitoreó la absorbancia de la resazurina a 570 nm, utilizando 600 nm como referencia. 2.- El número de células se determinó con una curva de calibración para determinar hasta 200,000 células, graficando el número de células vs el porcentaje de reducción. 3.- El número de células que se adhirieron al poliHIPE (t=0) se calcularon de la siguiente manera:

<u>Curva de calibración:</u> 1.- En una placa de cultivo de 96 pozos se agregaron en pozos independientes 2500, 5000, 10000, 12500, 25000, 50000, 100000 y 200000. osteoblastos y la placa se incubó con medio de crecimiento a 37°C y 5% CO₂ por 24 h. 2.- Se retiró el medio de cultivo y se les agregó medio nuevo con 10% (v/v) de resazurina (0.02%). Las células se incubaron por 4h a 37°C y 5% CO₂. Para su lectura por espectrofotometría, se tomaron 150 μ L de resazurina reducida y se colocaron en otra placa. 3.- Se monitoreó la absorbancia de la resazurina 570nm, utilizando 600nm como referencia. 4.- El porcentaje de reducción se calculó con la siguiente fórmula:

$$% Reducción = ((E_{oxi}600 * A_{570} - E_{oxi}570 * A_{600}) / (E_{red}570 * C_{600} - E_{red}600 * C_{570})) * 100$$
(4)

Dónde: $E_{oxi}600=117,216$, $E_{oxi}570=80,586$, $E_{red}570=155,677$, $E_{red}600=14,652$, $A_{570}=$ Absorbancia observada de la muestra a 570 nm, $A_{600}=$ Absorbancia observada de la muestra 600 nm, $C_{570}=$ Absorbancia observada del control a 570 nm, $C_{600}=$ Absorbancia observada del control a 600 nm. El control, son las células que crecieron en medio de cultivo sin ningún tratamiento.



Figura 14. Curva de calibración de los osteoblastos, el tiempo de incubación con la resazurina fue de 4h.

2.7.5 Detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en osteoblastos y fibroblastos

Las ROS se cuantificaron porque tienen un papel importante en el estrés oxidativo de las células y por lo tanto en el crecimiento de las mismas. Este ensayo se realizó con el reactivo MitoSOX, un colorante fluorogénico altamente selectivo para el radical libre superóxido O_2^- . El MitoSOX es permeable a las células vivas y se dirige específicamente a la mitocondria, por lo que refleja directamente el estrés oxidativo de la

célula y por lo tanto su actividad metabólica. Una vez en la mitocondria, el MitoSOx se oxida por el O_2^- y el producto es fluorescente al unirse a los ácidos nucleicos de la mitocondria. Este reactivo tiene una máxima absorción y emisión de 510/580nm (Molecular Probes, 2005)

<u>Cultivo de las células en los andamios:</u> 1.- En una placa de cultivo de 12 pozos los poliHIPEs fueron hidratados por 10min con medio de cultivo, cada pozo (1) contenía 500 µL de medio DMEM. 2.- Los poliHIPEs se inocularon con 150,000 células por pozo y se incubaron por 24 y 96 h a 37°C y 5% CO₂. 3.- Para el control positivo, después de 12 h se sustituyó el medio de crecimiento por DMSO, para inducir la generación de ROS.

<u>Preparación del reactivo MitoSox:</u> 1.- Se preparó una solución stock 5mM del reactivo MitoSox (inmediatamente antes de utilizar) disolviendo 50 μ g del indicador de superóxido mitocondrial (componente A) en 13 μ L de DMSO (Componente B). 2.-Se diluyó la solución anterior con PBS para obtener una concentración final de 5 μ M.

<u>Tripsinización de las células</u>: 1.- Se retiró el medio de cultivo y se separó el poliHIPE en un tubo de 1.5mL (A). 2.- Se agregaron 100 μ L de tripsina en cada tubo A y éstos se incubaron por 6min a 37°C y 5% de CO₂. 3.- Se lavó el pozo con 100 μ L de PBS 1X y éste se depositó en un tubo de 1.5mL (B). 4.-Se agregaron 100 μ L de tripsina en cada pozo y la placa se incubó por 3min a 37°C y 5% de CO₂. 5. Las células despegadas del pozo se depositaron en el tubo B. 6.- Las células del tubo A y B se centrifugaron a 1200rpm por 5min.

Incubación de las células con el reactivo MitoSox: 1.- El pellet obtenido de la centrifugación se resuspendió en 500 μL de PBS 1X. Las células en el tubo se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. 2.- Se agregó la cantidad necesaria de MitoSox para obtener una concentración final de 5 μM y el tubo se incubó a 37°C con 5% CO₂ por 1.5h. 3.- Posterior a la incubación, se centrifugaron las células a 1200rpm por 5min, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS 1X. 4.- Las células obtenidas del paso anterior (3), se analizaron por citometría de flujo con un citómetro Attune NXT con los siguientes parámetros FSC= 470, SSC=425, VL2, Ex/Em =510/580nm. Contando por lo menos 10,000 eventos por lectura y realizando tres lecturas independientes.

2.7.6 Ensayos de diferenciación en osteoblastos de ratón mediante la detección de fosfatasa alcalina

Los osteoblastos tienden a diferenciarse en osteocitos que son las células que depositan calcio. Los osteoblastos inmaduros antes de convertirse en osteocitos tienen diferentes fenotipos que se relacionan con la actividad de diferentes enzimas. Los ensayos para determinar si los osteoblastos cultivados en los andamios iniciaban su proceso de diferenciación hacia osteocitos, se realizó mediante la determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (ALP) a través de un método colorimétrico, utilizando el sustrato BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato p-toluidina, sal) /NBT (nitroazul de tetrazolio). Dicho sustrato produce un precipitado insoluble de color morado intenso (NBT diformazán) que se puede observar visualmente (Brauer *et al.*, 2015).

El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

<u>Cultivo de las células en los andamios</u>: 1.- En una placa de cultivo de 96 pozos se hidrataron los poliHIPEs por 30min con 100 μ L de medio MEM-alfa suplementado. 2.- Los poliHIPEs se inocularon con 10,000 osteoblastos en un volumen de 100 μ L de medio MEM-alfa suplementado y se incubaron por 24 y 120 h a 37°C y 5% de CO₂.

<u>Preparación de la solución BCIP/NBT</u>: 1.- En un tubo de 15 mL se agregaron 4 mL de agua destilada y se añadió 1 mL de BCIP /NBT para completar 5 mL.

Lavado de las células: 1.- Se tomaron las células de la incubadora y cuidadosamente se aspiró el medio. (no se retiró el poliHIPE del pozo, ya que las células se encuentran en la superficie y en el interior de éste) Después se lavaron las células con 200 µL PBS 1 X, tratando de no romper la monocapa ni el material. 2.-Se aspiró el PBS y se agregaron 200 µL de formalina al 10% diluida en PBS 1 X para cubrir la monocapa de células. Después de 60 s se desechó la formalina y se lavaron las células con 200 µL de PBS 1X. 3.-Se agregaron 200 µL de la solución BCIP/NBT al pozo para cubrir la monocapa. 4.-Se incubaron las células a temperatura ambiente por 4 h. 5. Se tomaron 200 µL de la solución de cada pozo y se colocó en una caja nueva de 96 pozos para ser leídos a 405nm mediante un espectrofotómetro de placas. 6.-Se observó el color del material para registrar la presencia del color morado indicativo de la actividad de fosfatasa alcalina. NOTA: Se tomó como control negativo a las células que sólo crecieron en medio de crecimiento.

2.7.7 Evaluación de la hemocompatibilidad de los poliHIPEs

La evaluación de la biocompatibilidad de biomateriales es necesaria para identificar sí la composición química del material y/o subproductos que el material pudiera liberar no desencadenen una respuesta citotóxica. La ISO 10993-4:2017 especifica los requerimientos generales para evaluar las interacciones de aparatos/materiales médicos con la sangre. Y define la hemocompatibilidad como cualquier material/aparato que pueda estar en contacto con la sangre sin presentar una reacción adversa significativa como trombosis, hemólisis y la activación de plaquetas/leucocitos/el complemento, entre otros eventos adversos asociados. Para evaluar la hemocompatibilidad de los materiales se realizó una prueba de hemólisis.

El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

<u>Hidratación de los andamios:</u> 1.- Los poliHIPEs se hidrataron en una solución fisiológica salina (PBS 1X) por 1h.

Preparación de eritrocitos: 1.- Se obtuvieron 25 mL de sangre de un donador humano y se colocó en un tubo BD Vacutainer (R) con EDTA- K2 para prevenir la coagulación. Después de 8 a 10 veces de invertir el tubo se aseguró la homogenización del anticoagulante con la sangre, ayudando a prevenir la formación de coágulos. 2.- Se centrifugó la sangre a 3000 rpm por 5 min, y se marcó en el tubo el nivel de hematocrito (rojo, capa inferior) y el plasma (amarillento, capa superior). 3.- Se aspiró el plasma con una micropipeta, se inactivó con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 30 min y se descartó. 4.- Al tubo se le agregó 150 mM de NaCl hasta la marca (nivel de plasma original). Se invirtió el tubo cuidadosamente varias veces para mezclar y se centrifugó a 3000 rpm por 5min. 5.- Se aspiró la solución de NaCl y se repitieron los pasos 3 y 4 para lavar las células. Se desechó el sobrenadante y éste se sustituyó hasta la marca (nivel de plasma original) con PBS 1X. (Se invirtió el tubo cuidadosamente para mezclar). 6.- Se realizó una dilución 1:50 de eritrocitos, utilizando como diluyente el PBS 1X. Se agregó 1mL de eritrocitos en 49 mL de PBS 1X (sí no se forma un pellet entonces las células se lisaron).

Ensayo de hemólisis:

Para las muestras: Los poliHIPEs hidratados se colocaron en un tubo de 1.5 mL. Se le agregaron 270 μL de la dilución anterior de eritrocitos (asegurando que la solución stock quedara homogénea durante la transferencia) y se les añadió 30 μL de medio DMEM.

Para los controles positivos: A 270 μL de la dilución de eritrocitos se le añadieron 30 μL de Triton 20% X-100.

Para los controles negativos: 1.- A 270 μ L de la dilución de eritrocitos se le añadieron 30 μ L de PBS 1X. 2.-Los tubos se incubaron por 1 h a 37°C y 5% de CO₂ 3.- Los tubos se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm para precipitar los eritrocitos intactos que no sufrieron lisis. 4.- Se agregaron 250 μ L del sobrenadante a una placa de 96 pozos para su lectura. 5.- Se midió la absorbancia de los sobrenadantes en un lector de placa con las longitudes de onda 405, 450 y 541 nm.

<u>Determinación del porcentaje de hemólisis</u>: La longitud de onda se seleccionó dependiendo sí los datos de hemólisis de las muestras se pueden normalizar con respecto a la hemólisis máxima inducida por el 20% Triton X-100 (control positivo).

El porcentaje de hemólisis se calculó de la siguiente manera: 1.-Se determinó el promedio de la absorbancia de los controles negativos. 2.-Se le restó este valor a cada muestra. 3.-Se determinó el promedio de la absorbancia del control positivo. Se normalizaron los controles y las muestras en las 3 longitudes (405, 450, 541 nm) a ese promedio, representando el valor del control positivo como el 100% de hemólisis. 4.-Se multiplicó cada valor por 100 para calcular el porcentaje de hemólisis respecto al control positivo.

3.1 Caracterización del DES

3.1.1 Análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La **Figura 15** muestra el espectro del ChCl, la urea y el del DES (ChCl:2Urea) respectivamente. Las bandas asociadas al ChCl como CH₃, CH₂, CCO, N-CH₃ y CO aparecen en el espectro de ChCl:2Urea, indicando que la estructura del ChCl no se perdió, es decir no ocurrió reacción química alguna. Las bandas encontradas son consistentes con el espectro obtenido por Du *et al.* (2016). El número de onda (cm⁻¹) y los modos vibracionales de los grupos funcionales en la urea, el ChCl y el DES, se encuentran resumidos en la **Tabla 2**. La frecuencia de estos modos es ligeramente diferente que los reportados en otros estudios, debido a que se utilizaron diferentes métodos de preparación de la muestra para el análisis.



Figura 15. Espectro de ChCl y del DES (ChCl:2Urea). Los números de las bandas en color rojo son las reportadas para el ChCl, los de color azul son los reportados por la urea y los de color negro no están reportadas por otros autores. La franja de color gris representa las bandas típicas de grupo -OH y del grupo C=O.

En el espectro del ChCl se muestra una señal intensa en 3220 cm⁻¹, asignada al estiramiento asimétrico del grupo –OH (v_{as} OH). El espectro del DES muestra una banda intensa y ancha con 2 picos en 3316 y 3188

cm⁻¹, que corresponden a la tensión (v_sNH_2) y flexión (δsNH_2) simétrica del -NH₂ pero que, como en el espectro del ChCl, también corresponde al grupo –OH. Esta superposición y ligera deformación de las bandas en el espectro de la urea pueden deberse a la formación de *EH* con el cloruro de colina. Cuando se establecen enlaces de hidrógeno entre los grupos funcionales bajo estudio, estos típicamente presentan un ensanchamiento en la banda correspondiente.

El espectro de la urea se muestran tres bandas en 1671, 1618 y 1591 cm⁻¹ como lo reportó Perkins *et al.* (2013). Las dos bandas en 1671 y 1618 cm⁻¹ corresponden respectivamente a la flexión simétrica ($\delta_s NH_2$) y asimétrica ($\delta_{as} NH_2$) del (-NH₂) (Du *et al.*, 2016), mientras que la banda en 1591 cm⁻¹ corresponde a la vibración longitudinal del grupo (-C=O).

En el espectro del DES se encuentra una banda en 3188 cm⁻¹ que de acuerdo a Keuleers *et al.* (2013) es posible que corresponda a una combinación entre las bandas 1683 y 1605 cm⁻¹; flexión simétrica (δ_s NH₂) del –NH2 y vibración longitudinal del grupo (-C=O) respectivamente.

Los *EH* que pueden existir entre el cloruro de colina y la urea son (N-H)...(O-H) y (O=C)...(OH), también hay *EH* entre las mismas moléculas de urea (NH)...(O=C) y entre las mismas moléculas de ChCl (OH)...(Cl) como se ilustra en la **Figura 16**.

3.1.2 Análisis H¹ NMR

La **Figura 17** muestra el espectro de NMR del H¹ del DES (ChCl:2Urea). En él se observan 6 picos que se resumen en la **Tabla 3**. De acuerdo a los resultados de Gutiérrez *et al.* (2009) los picos en 3.19, 3.5 y 3.94 δ corresponden a los H¹ en N(CH₃)₃, -aCH₂ y –bCH₂ en el ChCl, el pico en 6.14 δ corresponde a los H¹ en R(– NH₂)₂ de la urea y el pico en 5.22 δ corresponde al –OH del ChCl.

El pico en 7.2 δ se debe al disolvente usado como referencia externa, CDCl₃.

La **Figura 18** muestra los desplazamientos (ppm) del ChCl y la urea obtenidos de la base de datos SDBSWeb. Se observan diferencias en los desplazamientos de algunos H¹ en comparación con el espectro del DES puro. Estas diferencias se deben a que el entorno electrónico de los núcleos es diferente en el DES que en sus componentes individuales disueltos en el disolvente deuterado correspondiente. Los EH que existen entre el ChCl y la urea son los siguientes (N-H⁻⁻O-H, O=C⁻⁻OH y OH⁻⁻Cl). Por lo tanto, para los núcleos de R(– NH₂)₂ su desplazamiento (ppm) aumenta porque el núcleo del H¹ ahora siente con más fuerza el campo magnético, debido a la alta electronegatividad del O en el enlace N-H⁻⁻O-H, ocasionando que el núcleo tenga una densidad electrónica menor (fenómeno conocido como *downfield* o *deshielding* en inglés) y su desplazamiento aumente.



Figura 16. Enlaces de hidrógeno formados entre la urea y el ChCl. (A y B) ChCl-urea, (C y D) urea-urea, (E) ChCl-ChCl.

	Número de onda (cm ⁻¹)					
Grupo				DES		
tuncional	ChCl	Urea	DES	Du, C. <i>et al.</i> (2016)	Urea*	ChCl*
$v_{as}NH_2$		3427		3421	3447	
v _{as} OH						3418
$v_s NH_2$		3331	3316	3349	3347	
$v_{as}OH$	3220	3255		3257		3259
$\delta sNH_2vC=O$			3188			
$\delta_{as}OH$	3026		3024	3023		3057
vCH			3006			3018
$\delta_{s} NH_{2}$		1671	1661	1669	1683	
$\delta_{as} NH_2$		1618	1605	1620	1631	
C=0		1591			1603	
ρCH ₃	1482		1478	1474		1489
$\rho_s NH_2$		1458	1430	1446	1468	1429
δs OH	1349					1347
v _{as} CN		1143	1165	1164	1166	
ρCH ₂	1085		1084	1084		1086
vC-O	1012	1002	1006	1005		1007
v_{as} CCO	954		953	955		958
$v_s N$ -CH ₃	866		864	865		867
ωC = Ο		786	784	785	788	
δCH_3	1378					1347
ρCH ₂	1274					1284
ωCH ₂	1142					1134
$\delta_{as}OH$						1632
$ au_{as} NH_2$		711			716	

Tabla 2. Comparación entre el espectro de FTIR del ChCl y el DES.

Número de onda en cm⁻¹ y su asignación.

s = simétrico; as = asimétrico; ω = débil; v =tensión; δ = flexión;

τ

=torsión fuera del plano; ρ = balanceo en el plano; w= balanceo fuera del plano . *Datos obtenidos de SDBSWeb: <u>http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/</u>

(Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología, AIST, 09.05.2018).



Figura 17. Espectro de NMR ¹H del DES en un tubo capilar.

Tabla 3. Desplazamientos químicos de los H¹ encontrados en el DES con sus respectivas integrales.

δ (ppm)	H^1	Integrales	
3.19	N(C H ₃) ₃	4.58	
3.5	aCH₂	1.05	
3.94	bC H₂	0.99	
5.22	ОН	0.38	
6.14	R(–N H ₂) ₂	4.01	



Figura 18. Valores de las señales de NMR 1H de los compuestos de la urea y el cloruro de colina. SDBS No. 2958: CH4N2O, 300MHz, en acetona + DMSO + tetrametilurea. SDBS No. 7932: C5H14ClNO, 399.65MHz, 0.05ml: 0.5mlD2O. *Datos obtenidos de SDBSWeb: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/ (Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología, AIST, 18.05.2018).

3.1.3 Análisis DSC

La **Figura 19** muestra el termograma del DES. En el ciclo de calentamiento del DES desde -60°C se observa un evento exotérmino en -12.4°C que corresponde a la temperatura de cristalización seguido de un evento endotérmico en 21.3°C que corresponde a la temperatura de fusión. Este comportamiento térmico es consistente con el de un cristal (Morrison *et al.*, 2009). La cristalización del DES comienza aproximadamente en -27.84°C y termina en -13.07°C y la fusión de la fase cristalina empieza aproximadamente en 2.42°C y termina en 21.31°C. Por lo tanto, el comportamiento térmico del DES durante el calentamiento involucra una fase de cristalización y una fase de fusión.

La reducción extraordinaria del punto de fusión se debe a las interacciones de EH que hay entre la urea y el ChCl, en especial entre los hidrógenos del grupo amino en la urea y los iones cloruro. En general, en mezclas binarias que contienen una sal, conforme la asimetría del catión de la sal aumenta, el punto de fusión de las mezclas disminuye (Abbot *et al.*, 2003).

El punto de fusión del DES es bajo y se puede notar que la mezcla es estable en el rango de temperatura de -60°C a 120°C. No se observa que en ese rango exista descomposición del DES.



Figura 19. Termograma DSC del DES (ChCl: 2Urea).

3.1.4 Determinación de la viscosidad

La viscosidad se midió en un rango de 293.15 a 363.15 K (20-90 °C) en intervalos de 10 K. El punto de fusión del DES como se determinó en el estudio de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es \approx 21.3 °C por lo tanto, es posible determinar el cambio de la viscosidad en ese rango. La **Figura 20** muestra la relación viscosidad-temperatura del DES. Como se esperaba, la viscosidad del DES disminuye con la temperatura; este comportamiento corresponde al de un líquido no Newtoniano y ha sido observado por otros investigadores (Abbot *et al.*, 2003; Mjalli *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2014).



Figura 20. Viscosidad en función de la temperatura del DES (ChCl:2Urea).

A 60°C, temperatura a la que se realiza la polimerización de la emulsión, la viscosidad del DES es de 80 mPa, que comparada con la del agua (0.469mPa) es 2 órdenes de magnitud mayor. De forma que, la alta viscosidad del DES limita la difusión en las gotas en la HIPE disminuyendo su maduración de Ostwald en la emulsión, haciéndola más estable (Carranza *et al.*, 2016).

3.2 Caracterización de la emulsión

3.2.1 Microscopía confocal

En la **Figura 21** se confirma que la fluorescencia roja emitida por la rodamina se encuentra en la fase continua de la emulsión, es decir en el monómero, debido a la baja hidrofobicidad del DES. La emulsión formada contiene la fase interna con una fracción de volumen (ϕ) del 80%. Por encima del 74% se considera que es una emulsión altamente concentrada (HIPE) y por lo tanto, las gotas que conforman esta fase exceden su empaque físico y se deforman a un arreglo más compacto (Cameron *et al.*, 1996). En las micrografías es posible percibir con claridad la deformación de las gotas en algunas regiones.

Se observa que al inicio de la medición (**Figura 21A**) las gotas tenían un tamaño aproximado de 51.3 \pm 19.6 μ m, pero mientras se prolonga el tiempo de análisis el tamaño de las gotas va aumentando. La desestabilización de la emulsión es provocada por el calor emitido del láser sobre la muestra. Al aumentar la temperatura, se disminuyen las interacciones de EH ente el ChCl y la urea; causando una disminución en la viscosidad del DES. Del mismo modo se promueve la maduración de Ostwald, la cual está mediada por la difusión molecular de gotas pequeñas a gotas más grandes (Carranza *et al.,* 2016).

A	B	c c c c c c c c c c c c c c c c c c c	D
		CARA A	MI D
1.000000000	C. CONTRACTOR		N MA
			JAZA
		CTC V	
50um	50um	100um	100um
51.3 ± 19.6 μm	63.2 ± 27.3 μm	71.2 ±32.6 μm	125 ± 78.8 μm
Max 120.3 µm	Max 175.7 µm	Max 175.4 µm	Max 310.1 µm
Min 10.3µm	Min 24.7 μm	Min 25.7 μm	Min 27.7 μm

Figura 21. Imágenes confocales de la HIPE de MMA antes de la polimerización. El promedio de los tamaños de las gotas en la HIPE, así como los tamaños máximo y mínimo de las gotas están debajo de cada imagen. A) n=151, B) n=137, C) n=116, D) n=30.

En la **Figura 22** se muestra la emulsión *pickering* (MMA-NHA) antes de la polimerización la cual ha sufrido una inversión de las fases que la componen como resultado de una desestabilización. En esta emulsión se observa que la fluorescencia emitida por la rodamina se encuentra como fase interna, contrario a lo que se observó con la muestra sin NHA (**Figura 21**). De manera que la dispersión mecánica del HIPE a través del vórtex, en esta muestra en particular no proveyó la energía mecánica necesaria para que la fase orgánica de monómeros emulsificara al DES para finalmente formar una emulsión altamente concentrada. En muestras subsecuentes que no se analizaron por medio de microscopía confocal, la formación de la HIPE se verificó por la obtención del correspondiente poliHIPE, como se discutirá más adelante.



Figura 22. Imagen confocal de la HIPE-*pickering* desestabilizada (inversión de fases) de MMA con NHA antes de la polimerización observadas con microscopía confocal, usando el marcador fluorescente Rh6G.

3.3 Caracterización de los poliHIPEs

3.3.1 Microscopía electrónica de barrido

En la **Figura 23, 24 y 25** se muestra que los poliHIPE pMMA, pMMA-NHA y pSMA-NHA tienen una estructura macro-porosa, que consiste en poros interconectados por ventanas. En las micrografías se puede observar que los poros están compactos y en forma de poliedros. El tamaño del poro para pMMA es de $13.2 \pm 4.2 \mu m$ (**Figura 23**) y es diferente (p<0.01) al tamaño de gota que se observó en microscopía confocal (51.3 ± 19.6 µm). El tamaño de poro para pMMA-NHA es de $10.34 \pm 2.9 \mu m$ (**Figura 24**), 8.4 ± 2.1 µm para pSMA-NHA (**Figura 25**). Los tamaños de poro en los poliHIPEs pMMA y pMMA-NHA son ligeramente mayores a los que reportó Carranza *et al.* (2014 y 2017), tal como se puede observar en la

Tabla 4, aunque al considerar la desviación estándar, debida a la polidispersidad de los poros inherente al protocolo de síntesis usando HIPEs, se encuentran en el mismo intervalo de tamaños, observando también que la adición de NHA no altera el rango en el tamaño de poro.

En la **Figura 26-A** se muestra la micrografía de SEM de polvo del poliHIPE pLA-NHA y en la **Figura 26-B** se muestra una porción del poliHIPE pLA-NHA. Se observa que el polvo de pLA-NHA tiene una estructura macroporosa con un tamaño de poro cercano a los 20 µm, tamaño que se asemeja a los resultados reportados por Carranza *et al.* (2014). En la **Figura 26-B** se observan algunos poros con tamaños de 6.4 ± 2.8 µm.



Figura 23. Micrografía SEM de pMMA después de la extracción de la fase interna (DES). A) pMMA, 15kv (1000 X), B) pMMA, 15Kv (2500 X).



Figura 24. Micrografía SEM pMMA-NHA después de la extracción de la fase interna (DES). A) pMMA-NHA, 10 Kv (750 X), B) pMMA-NHA, 10Kv (2000 X).



Figura 25. Micrografía SEM de los poliHIPEs después de la extracción de la fase interna (DES). A) pSMA-NHA, 20Kv (1000 X) y B) pSMA-NHA, 20kv (2500 X)



Figura 26. Micrografía SEM de los poliHIPEs después de la extracción de la fase interna (DES). A) pLA-NHA, 1.0 Kv y B) pLA-NHA, 1.0 Kv.

Muestra	Diámetro poro (μm) Carranza <i>et</i> al. (_a 2014 y _b 2017)	Tamaño de gota confocal (μm) Carranza et al. (a2014 y b2017)	Área superficial específica (m ² g ⁻¹) Carranza <i>et</i> al. (_b 2017)	Porcentaje de conversión Carranza <i>et</i> al. (_b 2017)	Diámetro poro (µm)	Tamaño de gota confocal (μm)	Porcentaje de conversión
рММА	$6.3 \pm 2.4_{b}$	7.4 ± 2.7 _b	1.7 _b	99.1 _b	13.2 ± 4.2	51.3 ± 19.6	>95
pMMA-NHA	$8.7 \pm 1.8_{b}$	8.6 ± 1.5 _b	nd	98.7 _b	10.34 ± 2.9	nd	>99
pLA	$14 \pm 4.6_{a}$	13.1 ± 6.4	1	90.8 _a	nd	nd	nd
pLA- NHA	-	-	-	-	11.5 ± 2.8	nd	nd
pSMA	14.6 ± 2.9 _a	14.4 ± 3.6	nd	86.3 _a	nd	nd	nd
pSMA- NHA	-	-	-	-	8.4 ± 2.1	nd	nd

Tabla 4. Comparación de las propiedades morfológicas de los poliHIPEs.

Nota: Datos obtenidos de Carranza *et al.* (a2014 y b2017), nd: no determinado. Las tres últimas columnas muestran los resultados de este trabajo.

3.3.2 Microtomografía de rayos X (µ-CT)

La **Figura 27(a)** muestra el poliHIPE pMMA-NHA segmentado en un cubo de 600*600*600 voxeles para eliminar el ruido de los bordes de la muestra. Un vóxel es la unidad cúbica que compone un objeto tridimensional. Al aplicar el filtro *Anisotropic Diffusion* se reduce el ruido de la imagen sin remover partes significativas de la muestra **Figura 27 (c)**.

Una vez que la muestra se filtró se separó digitalmente en dos fases, la fase conformada por el polímero y la formada con NHA. La **Figura 28 (a y b)** muestra la NHA que está en el cubo segmentado de la muestra pMMA-NHA. La **Figura 28 (d)** muestra la separación de los poros de una porción del cubo de pMMA-NHA (el tamaño de un pixel equivale a 0.44µm) a través del método de valor umbral por medio del algoritmo numérico Otsu. Una vez separados se realizó un análisis de distribución de tamaños en volumen. La porosidad del poliHIPE es del 68%, el porcentaje de NHA es de 0.018% y el área superficial específica (m²/m³) es de 1.0 (**Tabla 5**).



Figura 27. (a) pMMA-NHA segmentado en un cubo, (b) poros segmentados de la muestra pMMA-NHA, (c) segmento mostrando matriz y poros, (d) segmento mostrando los poros segmentados.



Figura 28. En la figura a) podemos observar la reconstrucción 3D de la NHA en la muestra PMMA-NHA y en b) la amplificación de la zona delimitada por un círculo rojo. (c) poros de la muestra pMMA-NHA, (d) poros segmentados de la muestra pMMA-NHA.

Tabla 5. Distribución de tamaños de los poros de pMMA-NHA y valores de porosidad, % NHA y área superficial específica.

		x= 714.5	
Volumen	3d (µm³)	máx= 21837.7	
		min= 0.09	
		x= 347.3	
Área	3d (µm²)	máx= 6168.5	
		min= 0.6	
Porosidad	%	67.5	
NHA	%	0.018	
Área Superficial Específica	m²/m³	1.0	

3.3.3 Difracción de rayos X

La **Figura 29** muestra los espectros de difracción de rayos X realizado sobre las muestras: NHA, pMMA y pMMA-NHA. La NHA presenta los picos de difracción de la HA, basados en la tarjeta de XRD de la HA (JCPDS No. 09-432). Por otro lado, el poliHIPE pMMA-NHA presentan picos en el espectro de la NHA pero en menor intensidad; estos picos no se observan en el poliHIPE sin NHA.



Figura 29. Patrón de XRD de polvo de NHA pura, de pMMA y pMMA-NHA con 1% de NHA.

3.3.4 Pruebas mecánicas

El esfuerzo de compresión para pMMA es de 170 kPa, mientras que para pMMA-NHA es de 6.7 ± 0.5 kPa (**Figura 30**). La adición de NHA en el poliHIPE disminuye significativamente el esfuerzo de compresión. El módulo elástico de pMMA es de 0.34MPa, y el de pMMA-NHA es de 0.18MPa. Igualmente se observa un decremento en el módulo elástico del poliHIPE con NHA, sugiriendo que éste tiene mayor elasticidad que el poliHIPE sin NHA. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Carranza *et al.* (2017).



Figura 30. Esfuerzo de compresión y B) Módulo elástico de pMMA y pMMA-NHA. Los resultados se presentan como el promedio ± desviación estándar de un ensayo medido por triplicado.

3.4 Resultados de Biocompatibilidad

3.4.1 Resultados de la viabilidad celular de HFF-1

La **Figura 31** muestra la viabilidad de los fibroblastos de humano HFF-1 cultivados por 96 h en los poliHIPEs (pLA y pLA-NHA). La viabilidad se determinó por el ensayo MTT. Es importante resaltar que la cantidad de MTT reducido y cuantificado como porcentaje, es un reflejo directo de la actividad metabólica de la célula, en particular de la funcionalidad de la mitocondria. Las barras en la **Figura 31** indican el crecimiento de las células HFF-1 en presencia de los diferentes poliHIPEs. En ese sentido, es posible observar que los fibroblastos crecieron un 83.5% más en el poliHIPE pLA y un 93% más en el poliHIPE pLA-NHA, respecto de las células control que no fueron incubadas con los poliHIPEs.

Estos resultados soportan la idea de que los poliHIPEs presentan una actividad promotora del crecimiento celular.



Figura 31. Ensayo de viabilidad celular de los fibroblastos de humano HFF-1 en presencia de pLA y pLA-NHA. Las células HFF-1 se cultivaron en presencia de los poliHIPEs por 96 h. La viabilidad celular se determinó por la reducción del MTT. Los resultados representan el promedio ± la desviación estándar del ensayo medido por triplicado. El análisis estadístico que se realizó fue un *ANOVA-one way* con el software Minitab18; en el cual p>0.05 y no hay diferencia significativa en los datos de las muestras pLA y pLA-NHA.

3.4.2 Resultados de la proliferación celular de HFF-1

La **Figura 32** expone la proliferación de los fibroblastos HFF-1 a las 96 h de su cultivo con los poliHIPEs (pLA y pLA-NHA). La proliferación se determinó por la fluorescencia del reactivo CFDA-SE hidrolizado. Los resultados sólo muestran el CFDA-SE hidrolizado de las células vivas. En la **Figura 32** se observa el porcentaje de proliferación celular en cada poliHIPE y su comparación respecto del control (caja Petri). La proliferación respecto al control se incrementó un 93% para pLA y un 85% para pLA-NHA. De modo que ambos poliHIPEs además de ser biocompatibles, promueven la proliferación de los fibroblastos. Cabe resaltar que la molécula fluorescente producto del CFDA-SE hidrolizado no se transfiere a las células adyacentes, sino que es heredado mediante los procesos de citocinesis en la división celular.



Figura 32. Los poliHIPEs promovieron la proliferación celular de los fibroblastos. Las células HFF-1, se cultivaron con la presencia de los poliHIPEs pLA y pLA-NHA por 96h y en este punto se determinó la proliferación celular por la hidrólisis del reactivo CFDA-SE. Los resultados se presentan como el promedio ± desviación estándar de un ensayo por citometría de flujo medido por triplicado. El análisis estadístico fue a través de la prueba *ANOVA-one way*, con el software Minitab18; en dónde, p <0.05, por lo tanto, existe diferencia significativa entre las medias de pLA y pLA-NHA y el control, pero no entre pLA y pLA-NHA.

3.4.3 Resultados de la determinación de la proliferación de osteoblastos de ratón MC3T3-E1

En la **Figura 33** se observa el número de células que se adhirieron al poliHIPE después de incubar 12,500 células con éste durante 24h, también se muestra la proliferación celular después de 48 h. En la figura se puede observar que en general se adhirieron muy pocos osteoblastos respecto a la cantidad de células que se añadieron inicialmente (12, 500), en especial para los poliHIPEs pMMA7-NHA (56 células) y pLA7 (83 células). Sin embargo, a pesar de ello, el número de células que se estimaron después de 48 h de incubarse en el poliHIPE fue considerablemente mayor, lo que refleja que ambos poliHIPEs promueven la división celular de los osteoblastos adheridos. En la **Figura 34**, se observa el número de veces que se incrementó la división celular de las células inicialmente adheridas al poliHIPE. El número de células que se adhirieron al poliHIPE a las 24h se normalizaron a 1. En la figura se muestra que la proliferación que tuvieron los osteoblastos para los seis poliHIPEs fue significativa, en especial para los materiales pMMA-NHA, pSMA-NHA y pLA.



Figura 33. Número de células que se adhirieron y proliferaron en los PoliHIPEs. Los osteoblastos se cultivaron con la presencia de los PoliHIPEs por 24 h y en ese punto se determinó por el ensayo de reducción de rezasurina el número de células adheridas al poliHIPE. Posteriormente, la proliferación de las células adheridas se determinó a las 48 h. Los resultados se determinaron por una curva de calibración.



Figura 34. Incremento en el número de células que se adhirieron y proliferaron en los poliHIPEs. Los osteoblastos se cultivaron con la presencia de los poliHIPEs por 24 h y en ese punto se determinó, por el ensayo de reducción de rezasurina, el número de células adheridas al poliHIPE. Posteriormente, la proliferación de las células adheridas se determinó a las 48 h. Los resultados se determinaron por una curva de calibración.

3.4.4 Determinación del estrés oxidativo para los fibroblastos de humano HFF-1

Los ROS producidos por los fibroblastos de humano (HFF-1) se midieron después de estar en contacto por 96 h con los poliHIPEs pLA y pLA-NHA. Estos resultados muestran los radicales libres superóxido O_2^- en las células vivas.

La producción de O_2^- se estimó tomando como referencia la fluorescencia del control negativo, que son las células cultivadas únicamente en medio de cultivo. Las columnas en la **Figura 35** representan el promedio de las mediciones de un ensayo por triplicado.

Los resultados muestran que, respecto al control, la producción de O_2^- de las células que crecieron en el pozo es 0.79 veces más en pLA y 2.41 veces más en pLA-NHA, considerando que la proliferación celular de ambos poliHIPEs era similar.

3.4.5 Determinación del estrés oxidativo en osteoblastos de ratón MC3T3-E1

Los ROS producidos en los osteoblastos al estar en contacto por 24 h con los poliHIPEs se detectaron utilizando el reactivo MitoSOX. Estos resultados muestran los radicales libres superóxido O_2^- en las células vivas, producto de la oxidación del MitoSOX en la mitocondria. La producción de O_2^- se estimó tomando como referencia la fluorescencia del control negativo, que son las células cultivadas únicamente en medio de cultivo y que reflejan las condiciones normales de crecimiento celular. Las columnas de la **Figura 36**, representan el promedio de las mediciones por triplicado.

Los resultados muestran que, respecto al control, la producción de O_2^- de las células que crecieron en los poliHIPEs es mayor, 6 veces más en pMMA-NHA y pSMA-NHA, 4 veces en pSMA y el doble para pMMA y pLA7-NHA. De los 3 materiales que contienen NHA sólo el de pLA-NHA tiene una concentración de O_2^- menor.



Figura 35. Niveles de ROS en fibroblastos de humano HFF-1. Se determinaron los niveles de ROS mitocondrial derivados de los HFF-1 al estar en contacto por 96 h con los poliHIPEs pLA y pLA-NHA. Se tomó el control como referencia para determinar la fluorescencia en los tratamientos. Los resultados representan el promedio ± la desviación estándar del ensayo medido por triplicado e indican la suma de los ROS en las células que crecieron en los poliHIPEs y los producidos por las células que crecieron en presencia de éste (pozo). El análisis estadístico que se realizó fue un*ANOVA-one way*, con el software Minitab18; en dónde, p>0.05, por lo tanto no existe diferencia significativa entre las medias.



Figura 36. Niveles de ROS en osteoblastos de ratón MC3T3-E1. Se determinaron los ROS derivados de los osteoblastos al estar en contacto por 24h con los poliHIPEs. Se tomó el control (células crecidas en medio de cultivo) como referencia para determinar la fluorescencia en los tratamientos y se utilizó DMSO como control positivo. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar del ensayo medido por triplicado El análisis estadístico que se realizó fue un *ANOVA-one way*, con el software Minitab18; en donde, * p<0.05, indicando que es significativamente diferente respecto al control.
3.4.6 Resultados del ensayo fosfatasa alcalina

La expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) en los osteoblastos es un marcador temprano de la diferenciación de éstos a osteocitos. La **Figura 37** muestra la expresión de la ALP en los osteoblastos después de cultivarlos con los poliHIPEs durante 24 h. Se observó en los poliHIPEs una tinción de color rosado-morado, indicando la presencia de la ALP.

En el ensayo colorimétrico sólo se puede observar visualmente el precipitado de color morado, los resultados únicamente nos indican la presencia o ausencia de la enzima en las células. Por lo tanto, no se observa diferencia en la expresión de ALP entre los tres diferentes monómeros (MMA, SMA y LA) utilizados. Tampoco se distingue una diferencia entre los poliHIPEs funcionalizados con NHA comparados con los materiales sin funcionalizar. Sin embargo, esta información cualitativa puede ser corroborada con las lecturas de la actividad de la ALP a 405 nm. En la **Figura 38** se observa la actividad de la ALP en los 6 poliHIPEs a las 24 y 120 h. A las 24 h (1d) **Figura 38**-A sólo la actividad de ALP en pMMA es significativamente diferente respecto al control (p <0.05). A las 120 h (5d) **Figura 38-B** la actividad de ALP en los poliHIPEs pSMA-NHA y pLA-NHA es significativamente mayor respecto al control (p<0.05).



Figura 37. Los poliHIPEs promueven la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) en los osteoblastos. En los pozos dónde se cultivaron los osteoblastos con los poliHIPEs se observó un precipitado de color morado, mientras que en los controles (ALP negativo) no se tiñeron las células.



Figura 38. Diferenciación en osteoblastos de ratón MC3T3-E1. Se determinó la actividad de la ALP de los osteoblastos al estar en contacto por 24 h (A) y 120 h (B) con los poliHIPEs. Se tomó el control (células crecidas en medio de cultivo) como referencia. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar del ensayo medido por triplicado. El análisis estadístico que se realizó fue un *ANOVA- one way*, con el software Minitab17; en dónde, * p< 0.05 es diferente significativamente respecto al control.

3.4.7 Resultados de hemólisis

El ensayo de hemólisis evalúa la hemoglobina liberada en el plasma como un indicador de la lisis de eritrocitos. La cantidad de hemoglobina liberada se determinó después de que los eritrocitos estuvieron en contacto con los poliHIPEs, su cuantificación se realizó respecto al control positivo (100% hemólisis).

Debido a que uno de los puntos máximos de absorción de la hemoglobina es Λ = 541 nm y que los datos en las muestras se normalizaron respecto al 100% de hemólisis se decidió utilizar esa longitud de onda. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 39**, y demuestran que el porcentaje de hemólisis en los 6 poliHIPEs es menor al límite permitido por la ISO 10993-4:2002 que es del 5%. Por lo tanto, no hubo toxicidad directa de los poliHIPEs y éstos pueden ser considerados como hemocompatibles.



Figura 39. Los 6 poliHIPEs presentaron un porcentaje inferior al permitido (<5%).

4.1 DES

Las interacciones de enlace de hidrógeno (EH) entre el cloruro de colina y la urea se estudiaron a través de un análisis de IR y de H¹NMR.

En el espectro de IR del DES se identificaron los grupos funcionales característicos del ChCl concluyendo que su estructura no se perdió tras su asociación con la urea por medio de EH. Las bandas más significativas del espectro son las de los grupos funcionales -OH, -NH₂ y -C=O. Los ensanchamientos que presentaron estas bandas se deben a los EH que hay entre el ChCl y la urea. Se observa que hay ligeras diferencias en las bandas con lo reportado en la literatura (Du *et al.*, 2016; Keuleers *et al.*, 1999; Perkins *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2012), por el método en la preparación de la muestra que se utilizó para cada análisis (ATR versus transmisión en pastillas de KBr).

Los resultados del espectro de H¹NMR del DES puro permitió observar los desplazamientos químicos de los H¹ del ChCl y la urea. Los desplazamientos químicos y el número de H¹ asignados a cada señal correspondieron al DES puro y concuerdan con los resultados de Gutiérrez *et al.* (2009). El entorno electrónico de los núcleos es diferente en el DES que el de sus componentes individuales disueltos en disolventes deuterados, debido a los EH entre el ChCl y la urea. Los desplazamientos químicos que aquí se describen no son significativamente diferentes <5% a lo reportados por otros autores (Florindo *et al.*; 2014; Ge *et al.*, 2017) debido a las condiciones de análisis.

Tanto los resultados en FTIR como los de H¹NMR del DES concluyen que no hubo reacción química entre el cloruro de colina y la urea. Las interacciones que hay entre los componentes se debe a EH (N-H)^{...}(O-H), (NH)^{...}(O=C) y (OH)^{...}(Cl).

En cuanto al comportamiento térmico que se observó en el DES, éste es similar al que reportó Morrison *et al.* (2009). El termograma muestra que el DES tiene un punto de fusión (p.f.) de 21.3°C, este es considerablemente menor que el de sus componentes por separado p.f._{ChCl} = 302°C y p.f._{Urea} = 133°C. Esta disminución en el punto de fusión está relacionada con la fuerza de interacción entre sus componentes, la deslocalización electrónica que se produce a través de los enlaces de hidrógeno y debido a que sus iones no-simétricos (con tamaños diferentes) tienen una energía reticular baja (García *et al.*, 2015; Smith *et al.*,

2014). Las ventajas que tienen los DES con los líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs) está en su biodegradabilidad, su baja o nula toxicidad y su preparación a partir de sus componentes puros sin recibir una posterior purificación (Abbot *et al.*, 2004; Radosevic *et al.*, 2015).

En el termograma también se muestra que en el rango del análisis (-60°C a 120°C) no existe descomposición del DES; esta característica es importante para delimitar la temperatura en el que el DES puede usarse.

Referente a la viscosidad del DES, ésta disminuye conforme aumenta la temperatura, por consiguiente, su comportamiento corresponde al de un fluido no Newtoniano. En comparación de los DES que contienen ChCl como HBA, el que se forma con la urea tiene una alta viscosidad (Smith *et al.*, 2014). Esta alta viscosidad se le atribuye a la presencia de una red extensa de EH entre cada componente, que resulta en la menor movilidad de los componentes libres en el DES (Zhang *et al.*, 2012).

Tanto la temperatura de fusión como el rango de estabilidad térmica y la alta viscosidad del DES son propiedades favorables para el propósito del trabajo. Su baja temperatura de fusión permite que éste se utilice como disolvente a temperatura ambiente y el rango en que el DES es estable térmicamente es ideal para las condiciones que se requieren para la polimerización de los HIPEs. Por último, su alta viscosidad permite que éste se pueda utilizar como fase interna en las emulsiones HIPE porque limita la difusión y disminuye la maduración de Ostwald, por lo tanto, confiere una mayor estabilidad a las emulsiones en contraste con los HIPEs con fases internas acuosas (Carranza *et al.*, 2016).

4.2 HIPEs

Las microestructuras de las HIPES MMA y MMA-NHA se observaron con un microscopio confocal, en donde la fase continua se marcó con el marcador fluorescente Rh6G. La HIPE de MMA mostró gotas en forma de poliedros características de las HIPEs. El promedio del tamaño de las gotas observadas fue de 51.3 \pm 19.6 µm, comparando con los resultados que obtuvo Carranza *et al.* (2014) las gotas son 7 veces mayor. Esta diferencia de tamaños pudo deberse a la manera en que se preparó la muestra y el tiempo de análisis. Específicamente se observó que el tiempo de análisis por medio de microscopia confocal está acompañado de calentamiento focalizado sobre la muestra. Se observó que este calentamiento promueve la desestabilización de la muestra mediado por maduración Otswald, es decir las gotas grandes crecen a expensas de las pequeñas, provocando así la observación de gotas más grandes que las que originalmente se encontraban en la HIPE antes de someterlas al análisis de microscopía confocal. Estos tamaños originales fueron posteriormente verificados por el tamaño de poro resultante en el poliHIPE correspondiente por SEM.

Por otro lado, en la imagen confocal de la HIPE de MMA-NHA se observa que la fase interna es la que fluoresce, indicando una inversión de fase. Ésta puede deberse por un cambio en el equilibrio hidrófilicolipofílico del surfactante por el incremento en la temperatura de la emulsión inducida por el láser del microscopio confocal (Abbott, 2016) y/o por la adición de la NHA. Hu *et al.* (2016) utilizaron un portamuestras y cubre objetos cóncavos para analizar una emulsión de tipo p*ickering*, de manera que la emulsión no se vio afectada, también ocuparon otros marcadores fluorescentes (nile red & nile blue) diluidos en isopropanol para marcar la fase interna. Por lo tanto, la manera en que preparamos las muestras en estudio y el tiempo para realizar la observación afectó el tamaño de gota para la HIPE MMA y la estabilidad del híbrido surfactante-NHA en la HIPE MMA-NHA.

4.3 PoliHIPEs

En las imágenes de microscopía SEM y en la reconstrucción del poliHIPE pMMA-NHA por μ –CTes posible observar que los poliHIPEs tienen una estructura porosa interconectada. Un material con distintos niveles de porosidad e interconectividad es esencial para la nutrición, proliferación y la migración celular en los andamios para la ingeniería de tejidos (Loh *et al.*, 2013). La deformación de los poros de esferas a poliedros se debe a que la fase interna tiene una fracción de volumen (ϕ) mayor al 74%. Esta deformación se observó en las micrografías confocales de las emulsiones. Las microscopías del poliHIPE pMMA muestran tamaños de poro menores comparados a los observados por microscopía confocal. Los tamaños de poro de los poliHIPEs pMMA, pMMA-NHA, pLA-NHA y pSMA-NHA están en el rango de tamaño reportado por Carranza *et al.* (2017) a pesar de la adición de NHA en los poliHIPEs.

Las conversiones de los poliHIPES se determinaron dividiendo la masa del monolito seco entre su masa esperada en caso de que todos los monómeros y entrecruzantes reaccionaran para formar el polímero, las conversiones para ambos poliHIPEs fueron ≥ 95%, y son similares a los que reportó Carranza *et al.* (2017). La fase interna (DES) de la emulsión tiene ventajas sobre otros solventes, ya que su alta viscosidad puede modular la temperatura de polimerización, gracias a un incremento en la energía de activación en la

descomposición del iniciador (AIBN), lo cual ayuda a incrementar la conversión de los monómeros. El porcentaje de porosidad del poliHIPE pMMA-NHA determinado con el equipo μ –CT fue del 68% y el área superficial específica fue de 1.0 m²/m³, este equipo permitió observar una imagen 3D del poliHIPE en la que se visualiza su estructura interna **(Figura 42).**

Para asegurar la presencia de las NHA en el poliHIPE se realizó un análisis de difracción de rayos X, en donde se comparó el espectro de pMMA-NHA con el de pMMA y el de NHA puro. Los resultados de difracción de rayos X corresponden a los que reportó Carranza *et al.* (2017). En el pMMA-NHA se observaron algunos picos de difracción característicos de NHA pero con menor intensidad, que demuestra que durante el proceso de emulsificación éstas permanecieron en la interfase (fase continua- fase interna) de la emulsión y que durante la polimerización de la HIPE éstas permanecieron incluidas en la superficie del polímero. Los resultados de μ -CT y la segmentación de la fase polímerica de la cerámica en el poliHIPE también confirman la presencia de NHA en su interior. El porcentaje de NHA observado en μ -CT fue del 0.018%, este porcentaje es muy bajo respecto a la cantidad que originalmente se añadió a la HIPE (1 % P) respecto a la fase continua). Sin embargo, el equipo μ -CT sólo permite ver aglomerados cercanos a 450 nm, por lo que tamaños inferiores de NHA no es posible visualizar. Es posible que el resto de NHA que no se observó con el equipo μ -CT no está aglomerada y su distribución sea más homogénea en el poliHIPE.

A pesar de que el poliHIPE de MMA con NHA mostró una disminución en el esfuerzo de compresión, las NHA incrementan la hidrofobicidad del monolito según los resultados reportados por Carranza *et al.* (2017) medido por el ángulo de contacto del agua. Los resultados muestran que el módulo elástico del pMMA-NHA también es menor que el de pMMA. Idealmente, los andamios celulares deben exhibir propiedades mecánicas similares a las del hueso. Sin embargo, los poliHIPEs sintetizados no tienen el propósito de reemplazar el hueso sino funcionar como un material de relleno para fracturas de hueso esponjoso. El material deberá ser bioactivo (osteoinductivo y osteogénico) por tener una estructura porosa tridimensional e interconectada. Por lo tanto, se requiere cierto grado de elasticidad para asegurar que el material no se fracture y rompa cuando se implante en el tejido.

Owen *et al.* (2016) midieron el módulo de Young de poliHIPEs con una fase continua de 2 monómeros acrílicos (EHA, 2 etil hexil acrilato e IBAO, isobornil acrilato), utilizando agua como fase interna. Observaron que los módulos de elasticidad variaban en un rango de 63.01 ± 9.13 a 0.36 ± 0.04 MPa, el poliHIPE que tuvo el mayor módulo de Young contenía 100% de IBAO con una ϕ del 75%. Los módulos elásticos del pMMA y pMMA-NHA que reportamos son 0.34 y 0.18 MPa respectivamente, 185 veces menor que los valores máximos encontrados por Owen *et al.* (2016). Por otro lado, Wang *et al.* (2016) observaron que el

módulo de Young de sus PoliHIPEs aumentó de 2.7 \pm 0.46 a 8.9 \pm 1.7 MPa al adicionar HA, los PoliHIPEs contenían una fase continua de EHA e IBOA y una fase interna de agua. El incremento en el módulo de Young en el poliHIPE se incrementó al aumentar la concentración de HA (4 a 32% del total de la emulsión). Esta diferencia significativa en el módulo de Young de los poliHIPEs de Wang *et al.* (2016) respecto a los nuestros se debe al tamaño de la HA utilizado, ya que nosotros la ocupamos en nanómetros y ellos en micrómetros, también el porcentaje de HA que utilizamos (1 %P) fue menor al que ellos ocuparon. Wang *et al.*, 2016 también observaron que a altas concentraciones de HA la estabilidad de la emulsión fue mayor. En las micrografías observaron un tamaño de poro \approx 50 µm y agregados en las paredes de las paredes suponiendo que ahí se encontraban la HA, sin embargo, no hicieron un estudio de dispersión de rayos X para comprobar que la HA se quedó en el polímero y que no fue removida cuando retiraron la fase interna, ya que a comparación de nosotros ellos disolvieron la HA en la fase interna y no en la continua.

4.4 Biocompatibilidad

En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad de los 6 poliHIPEs con ensayos de citotoxicidad *in vitro* en fibroblastos humanos HFF-1 y mediante una prueba de hemólisis.

Cabe resaltar que la biocompatibilidad *in vivo* de los poliHIPEs pMMA y pMMA-NHA fueron previamente evaluados por Carranza *et al.* (2017). Estos poliHIPEs fueron implantados quirúrgicamente en dos sitios diferentes en el cuerpo de una rata, posteriormente se hicieron cortes histológicos de estos sitios en intervalos de 7, 30 y 90 días. A los 90 días se observó un proceso de inflamación no exacerbada consistente en una "reacción a cuerpo extraño" por ambos poliHIPEs, lo cual es típico para materiales hechos de PMMA usados comúnmente en cirugía cosmética en humanos.

La viabilidad celular en fibroblastos HFF-1 con los poliHIPEs pLA y pLA-NHA se determinó a través de un ensayo de MTT. Este reactivo determina la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Cuando las células mueren, éstas pierden la capacidad de convertir el MTT a formazán, ya que las enzimas mitocondriales encargadas de ello se inactivan por efecto de la muerte celular. Los resultados obtenidos muestran que los poliHIPEs no son tóxicos para los HFF-1, sino que incluso el porcentaje de reducción del MTT para ambos poliHIPEs es mayor que el control. Esto sugiere que el número de células en los poliHIPEs o su actividad metabólica es mayor que en el control. Vale la pena señalar que este ensayo refleja el metabolismo de las células viables y no la proliferación celular.

Livshin y Silverstain (2007) sintetizaron un poliHIPE de LA, sin embargo, no realizaron estudios de citotoxicidad. Por otro lado, Han *et al.* (2018) diseñaron una red vascular interconectada que contenía LA como monómero, la polimerización tuvo un 40-70% de rendimiento con bajo entrecruzamiento del monómero y fotoiniciador restante. Ellos estudiaron la viabilidad del material en células troncales derivadas de tejido adiposo humano (hASCS) con el ensayo vivo/muerto (*live/dead* en inglés), pero después de 7 días observaron un ≥27% de muerte celular; la razón de esta muerte fue que la complejidad de la estructura no permitió el suministro óptimo de nutrientes. Los resultados aquí expuestos demuestran que la viabilidad de los HFF-1 no se vio afectada en comparación con la viabilidad de las células hASCS. Esta diferencia se puede deber a que la estructura y forma que tiene el poliHIPE no afectó el suministro de nutrientes para los HFF-1 en comparación con la red vascularizada, también el porcentaje de polimerización que obtuvimos del monómero fue del 90% asegurando un mayor entrecruzamiento de éste y por lo tanto menor citotoxicidad por el monómero o iniciador residual.

Por las altas demandas de sangre en el tejido óseo, un requerimiento importante en los materiales diseñados para reparar/sustituir el hueso es el promover la angiogénesis; el suministro de oxígeno y nutrientes es también indispensable para el crecimiento de las células (Yi et al., 2016). Por esta razón es importante que la hemocompatibilidad de los materiales que estén en contacto con células sanguíneas sea evaluada. La norma ISO10993-1, es una guía internacional para la selección de ensayos de biocompatibilidad para dispositivos médicos. Ésta solicita una evaluación de la hemocompatibilidad para cualquier dispositivo que tenga contacto con la sangre, directa o indirectamente (guía ISO10993-4). Es por esta razón que cada vez más autores realizan ensayos para evaluar la hemocompatibilidad de sus materiales (Andiappan et al., 2013; Gui-Bo et al., 2009; Streifel et al., 2018). Los resultados de hemocompatibilidad (realizados en sangre humana completa utilizando un tubo con EDTA-K2 como anticoagulante) que obtuvimos en los 6 poliHIPEs mostraron un porcentaje de hemólisis inferior al 5%. Este porcentaje representa la cantidad de eritrocitos que fueron lisados cuando estuvieron en contacto con los poliHIPEs. En base a la guía ISO10993-4 se considera como hemocompatibles a aquellos materiales cuyos valores de hemólisis sean menores al 5%, por lo tanto, los 6 poliHIPEs evaluados en este trabajo son biocompatibles y no ocasionan lisis de los eritrocitos, por lo que pueden considerarse bio-seguros a nivel hematológico.

Tanto los resultados de viabilidad celular en HFF-1 como los de hemocompatibilidad validan que los reactivos utilizados, las condiciones de síntesis y el método para retirar la fase interna de los poliHIPEs fueron los adecuados, al no presentar citotoxicidad por parte de éstos.

Una vez que se determinó que los PoliHIPEs sintetizados son biocompatibles, se decidió evaluar su capacidad para promover la proliferación celular, para ello, se utilizaron dos tipos celulares importantes en la reparación tisular y ósea: fibroblastos humanos HFF-1 y osteoblastos de ratón MC3T3-E1. La proliferación de los fibroblastos HFF-1 en los poliHIPEs pLA y pLA-NHA se cuantificó a través de la fluorescencia del reactivo CFDA-SE hidrolizado. Las ventajas de utilizar este fluorocromo para medir la división celular es su alta estabilidad en el citosol y que al no ser tóxico, éste no modifica la viabilidad de las células (Wang et al., 2005). Los poliHIPEs tienen una estructura porosa interconectada que les permite tener una mayor área de contacto con las células para permitir una mayor proliferación celular (Hu et al., 2015). El tamaño del poro que se midió para el poliHIPE pLA fue de 14 \pm 4.6 μ m y considerando que el tamaño que los HFF-1 pueden llegar a alcanzar es \approx 80 µm (Ginzberg *et al.*, 2015), no fue posible que los HFF-1 crecieran en el interior de los poliHIPEs. A pesar de ello, los resultados de los 2 poliHIPEs evaluados mostraron un incremento en la proliferación celular ≥85% respecto al control (cultivados en una caja Petri). Además, los resultados de Carranza et al. (2017) sobre los cortes histológicos de rata después de implantar por 90 días los poliHIPEs pMMA y pMMA-NHA confirman que las células rodean al material, pero no entran en él. Al considerar el tamaño de poro (< 20 nm) y lo observado por otros autores (Ga et al., 2017; Chen et al., 2016; Hong y Madihally, 2010) las células sólo se adhirieron a la superficie de los poliHIPEs.

Existe una diversidad de trabajos que evaluaron la proliferación de HFF-1 cultivados en andamios celulares porosos. La variedad de andamios utilizados van desde materiales entrecruzados como hidrogeles no biodegradables de poly (2-alquil-2-oxazolina) (Heide *et al.*, 2017) y poly (N-hidroxietil acrilamida) con sericina de seda (Ross *et al.*, 2017), membranas 3D biodegradables de quitosán-gelatina (Huang *et al.*, 2005), poliHIPEs biodegradables de poly (E-caprolactona) (Busby *et al.*, 2001) y materiales no entrecruzados como hidrogeles biodegradables de quitosán-gelatina (Iyer *et al.*, 2011) pero todos con una porosidad interconectada. Los resultados que reportan es que la proliferación en HFF-1 cultivados en estos andamios celulares con poros en el rango de 70 a 140 µm fue mayor en comparación con el control (caja Petri) que no tenía esa estructura porosa.

No sólo la porosidad juega un papel importante en la proliferación celular sino también el tamaño del poro. El hueso tiene una estructura jerárquica en multiescala que se divide en cortical y esponjosa. La esponjosa está distribuida dentro del hueso y la cortical está localizada en la superficie formada por una lámina que contiene células hematopoyéticas, adiposas y vasos sanguíneos. Por lo tanto, es deseable que los poliHIPEs desarrollen un microambiente inducido por la presencia de poros con tamaños alrededor de 150-180 µm los cuales pueden proveer el suficiente espacio para que diferentes tipos celulares se adhieran y crezcan, pero que además se facilite el transporte de nutrientes y productos de desecho, nervios y vasos

sanguíneos. Se ha reportado que los poros con tamaños alrededor de 10-100 µm permiten el crecimiento de capilares, lo que facilitan el intercambio de nutrientes y el desecho de metabolitos. Y poros con tamaño alrededor de 10 µm proveen áreas específicas para la adhesión y adsorción de proteínas (Ga *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016; Hong y Madihally, 2010).

De acuerdo al tamaño del poro que se midió para el poliHIPE pLA ($14 \pm 4.6\mu$ m) se espera que los H-FF1 sólo se adhieran al poliHIPE, pero que su proliferación fuera mayor comparado con el control (caja de Petri).

La proliferación celular de los osteoblastos de ratón MC3T3-E1 en los 6 poliHIPEs se evaluó con la reducción del reactivo resazurina. El protocolo de este indicador rédox es similar al tetrazolium MTT, aunque ambos reactivos son reducidos por oxidoreductasas, la resazurina no depende de una enzima para que la reducción ocurra, además éste es ligeramente más sensible que el ensayo de MTT. Los resultados mostraron un incremento significativo en la proliferación celular con los poliHIPEs pMMA-NHA, pSMA-NHA y pLA. La diferencia entre la capacidad de inducir la proliferación celular de los 6 poliHIPEs, incluye el tipo de monómero, el largo de su cadena y la presencia/ausencia de NHA. Por ejemplo, el MMA y el SMA son metacrilatos mientras que el lauril es un acrilato. Tienen un largo en la cadena de C₁ C₁₂ y C₁₈ respectivamente para MMA, LA y SMA (**Figura 40**), con un tamaño de poro \leq 20 µm, un área superficial de 1 a 1.7 m²/g y de acuerdo a lo reportado por Carranza *et al.* (2014) los metacrilatos proveyeron altas conversiones.



Figura 40. Estructura de los monómeros ocupados para la síntesis de los poliHIPEs.

La humectabilidad de la superficie (conocido en inglés como *wettability*) es un factor importante en la adhesión, proliferación y migración de las células (Wang *et al.*, 20014). Zhang *et al.* (2009) estudiaron la influencia del grado de humectancia, medido como el ángulo de contacto de una gota de agua con el PMMA, donde se observó que la biocompatibilidad no se incrementó a pesar de que las superficies de los materiales tenían una buena hidrofilicidad. Los resultados en el ángulo de humectancia (ángulo de contacto) de pMMA y pMMA-NHA reportados por Carranza *et al.* (2017) indican que el poliHIPE que contenía NHA tienen un mayor efecto en la rugosidad en la superficie haciéndolo más hidrofóbico. Dowling *et al.* (2010) y Jangajac *et al.* (2012) estudiaron el efecto de la rugosidad de una superficie de poliestireno en la adhesión de osteoblastos, los resultados mostraron que las células se adherían mejor a superficies rugosas.

Por lo tanto, es de esperar que los poliHIPEs con NHA promuevan una mejor proliferación celular debido a su hidrofobicidad. Esta suposición es correcta respecto que los resultados de este trabajo indican que el incremento en la proliferación celular de los osteoblastos fue pLA > pMMA-NHA > pSMA-NHA. Sin embargo, el resultado que no concuerda es de pLA.

Hay diferentes estudios sobre la citotoxicidad de acrilatos y metacrilatos en solución, entre ellos el metil acrilato (MAA), lauril acrilato (LA), metil metacrilato (MMA) y lauril metacrilato (LMA). Estos estudios concluyen que todos los acrilatos evaluados son más tóxicos que los metacrilatos, siendo el MMA el que presenta menor toxicidad. También, el largo de la cadena y los grupos hidroxilos confieren una mayor citotoxicidad en ambos acrilatos y metacrilatos (Yoshii, 1996; Ishihara y Fujisawa, 2009; Tanii y Hashimoto, 1982; Dillingham *et al.*, 1983). El MMA es el monómero más utilizado como cemento de hueso, está clasificado como CLASE II (riesgo moderado a alto) por la FDA (FDA, 2012). También es el monómero comercial más usado como lente intraocular en cirugías de cataratas, porque es tolerable en el ojo con una reacción inflamatoria mínima (Wang *et al.*, 2014).

Los monómeros que utilizamos para los poliHIPEs están entrecruzados y los rendimientos de polimerización son > 90% indicando que el porcentaje de monómeros disueltos es despreciable. También, los poliHIPEs son lavados para retirar la fase interna, por lo tanto, el monómero residual se elimina.

Por lo tanto, a pesar de que los acrilatos disueltos presentan citotoxicidad, los poliHIPEs de LA con y sin NHA no presentaron citotoxicidad para los HFF-1, porque el entrecruzamiento del monómero reduce esta toxicidad. Foss y Peppas (2004) observaron que un hidrogel de ácido acrilico (AA) y polietilenglicol (PEG) con una proporción 2AA:1PEG no presenta toxicidad en células Caco-2 comparado con otros grados de entrecruzamiento.

Cabe señalar que hay estudios que describen cambios en la morfología de las células después de exponerlas por algunas horas a la resazurina o el MTT, interfiriendo con la función celular. Otra desventaja de utilizar estos reactivos es que el protocolo requiere una incubación del sustrato con las células a 37°C por un periodo de tiempo para que genere una señal. Esta incubación incrementa la posibilidad de errores, como el paso adicional del manejo de la placa (Sittampalam *et al.*, 2017). Por otro lado, el ensayo para medir la proliferación celular de los HFF-1 después de su incubación con los poliHIPEs pLA y pLA-NHA expresan un aumento significativo en la proliferación de las células respecto al control (crecidos en caja Petri). La proliferación celular se midió a través de la hidrólisis del CFDA-SE, reactivo que no modifica la viabilidad de las células y es más sensible que los ensayos MTT y resazurina (Wang *et al.*, 2005). Por lo tanto, es de considerar repetir el ensayo de proliferación celular de los osteoblastos con los poliHIPEs pLA y pLA-NHA con una técnica más sensible como la hidrólisis CFDA-SE para asegurar que la proliferación sigue esa tendencia ya que para los HFF-1 no se observó una diferencia significativa (p > 0.05) en la proliferación entre ambos poliHIPEs, utilizando esa técnica.

Como se ha visto, la NHA provee una mayor hidrofobicidad a los poliHIPEs y por lo tanto mayor afinidad por parte de las células, posiblemente a través de un efecto de rugosidad más que por un efecto de grupos funcionales expuestos. El tamaño, morfología y concentración de las NHA tienen un efecto significativo en la apoptosis de osteoblastos. Xu *et al.* (2011) estudiaron la inhibición del crecimiento y la apoptosis de osteoblastos con diferentes concentraciones de NHA (20, 40, 60, 80 o 100 mg/L) con diferentes morfologías y tamaños: cristales en forma de aguja (largo (L)= 30-50 nm, diámetro (D)= 10-20 nm), rodillo corto (L= 70-90 nm, D= 20-40 nm,), rodillo largo (L= 200-400 nm largo y D= 20-40 nm) y esféricas (D= 10-30 nm). Concluyendo que la proliferación de los osteoblastos es dependiente de la concentración de NHA (sí NHA es > 40 mg/L). Con un ensayo con Annexina V y un Western Blot determinaron que la muerte celular fue por apoptosis por la vía intrínseca. Cuando se comparó el efecto con la misma concentración de NHA, las que tenían forma de aguja fueron las que indujeron mayor muerte celular. Además, las NHA con mayores superficies específicas produjeron mayores niveles de ROS.

Por otro lado Shi *et al.* (2009) compararon también el tamaño (20 y 80 nm) y la forma (esférica y rodillo) de las NHA en la proliferación de osteoblastos MG-63, encontrando que las NHA con menor tamaño y con forma esférica promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis. Las nanopartículas que ocupamos

tienen tamaños ≈200nm y son esféricas, de acuerdo a los resultados que obtuvimos de viabilidad y proliferación celular en HFF-1 y MC3T3-E1 éstas no indujeron muerte celular.

También hay estudios que demuestran que las nanopartículas (\approx 100 nm) pueden producir la diferenciación de células mesenquimales (hMSC) a osteoblastos (Oh *et al.*, 2009; Dalby *et al.*, 2007). Por ejemplo, la presencia de nanopartículas rod-like de HA (580 nm) en poliHIPEs incrementa la proliferación de osteoblastos y estimula la mineralización de los materiales; en consecuencia, se observa una disminución en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), un indicador temprano de la diferenciación de células osteoblásticas (Lee *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2015).

La diferenciación osteogénica también se relaciona con la topología tridimensional en los poliHIPEs. Viswanathan *et al.* (2015) observaron que una estructura porosa interconectada con poros de 40-80 μ m tiene la capacidad de promover la diferenciación de hMSC. Robison *et al.* (2016) también reportaron la diferenciación de células mesequimales en poliHIPEs de dimetacrilato de fumarato de propileno con tamaño de poro ≈10 nm.

En los resultados de la actividad de la ALP, a las 24 h sólo el pMMA tiene una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (p < 0.05). Y a las 120 h los poliHIPEs pSMA-NHA y pLA-NHA son diferentes significativamente respecto al control (p<0.05).

Mengmeng *et al.* (2013) evaluaron la actividad de la ALP en MC3T3 E1 y HOB (osteoblastos humanos primarios) en andamios de PLGA y PLGA/NHA durante 1 y 2 semanas. Observando a las 2 semanas sólo un incremento del 9% en HOB con PLGA/NHA, las NHA tenian 205 ± 40 nm de longitud y 33 ± 6 nm de ancho. Nuestros resultados indican que los poliHIPEs con NHA promueven la respuesta de MC3T3 E1 con un incremento del 100.8% para pSMA-NHA y 114.28% para pLA-NHA.

La diferenciación de los osteoblastos *in vitro* e *in vivo* está caracterizado por 3 etapas: a) proliferación celular, b) maduración de la matriz y c) mineralización de la matriz. *In vitro*, la fase de la maduración es caracterizada por la máxima expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) (Promocell, 2018). Nuestros resultados indicaron que la proliferación de los osteoblastos fue mayor en los poliHIPEs que contenian NHA (pMMA-NHA y pSMA-NHA) pero que también la expresión de la ALP fue mayor para los poliHIPEs pSMA-NHA y pLA-NHA. Esto Indica que el poliHIPE pSMA-NHA promueve en los osteoblastos tanto la proliferación celular como la expresión de la ALP. Sin embargo, a las 24h la expresión de ALP en MMA-NHA ya era significativo (p<0.05) por lo tanto, valdría la pena evaluar si la expresión de ALP disminuyó a las 120 h

porque empezó la mineralización de la matriz. De manera que la expresión de la ALP en estos poliHIPEs está relacionada con el monómero y la NHA más que por la porosidad.

La proliferación celular va acompañada de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ya que participan como moléculas reguladoras de la división celular y la sobrevivencia. Si comparamos los resultados de proliferación celular en los osteoblastos con los medidos para la generación de ROS, veremos que tienen la misma tendencia, porque la producción de ROS corresponde con el número de células. Hay estudios que indican que los ROS provocan la inhibición en la diferenciación y mineralización de los osteoblastos (Abdollahi *et al.*, 2005; Arai *et al.*, 2007). Pero se ha reportado recientemente que los ROS también actúan como mediadores intracelulares en la diferenciación de estas células. Sin embargo, el rol que éstos tienen en este proceso es aún es incierto (Arakaki *et al.*, 2013; Atashi *et al.*, 2015). Por otro lado, los resultados de ROS en los HFF-1 son los mismos para ambos poliHIPEs (pLA y pLA-NHA), que como se vio anteriormente, la proliferación de los HFF-1 en éstos fue la misma, por lo tanto, la producción de ROS corresponde con la proliferación celular de HFF-1.

Dos características que tienen los poliHIPEs en estudio y que los hace ideales para la ingeniería de tejidos ósea, es que pueden hidratarse sin cambiar sus dimensiones y que al hidratarse no se disuelven. Esto no pasa con otras estructuras porosas como los hidrogeles, ya que éstos tienen la capacidad de absorber del 10-20 % hasta miles de veces su peso seco en agua y por consiguiente éstos se hinchan modificando sus dimensiones y afectando la integridad mecánica del andamio. Muchas de las fracturas ocasionadas por la pérdida de hueso esponjoso y que no se pueden reparar, necesitan de biomateriales parar rellenar los huecos y que mantengan/restauren las propiedades mecánicas del hueso. De manera que es importante que el biomaterial provee suficiente integridad mecánica para funcionar durante todo el tiempo de implantación. La desventaja que tienen los materiales biodegradables es que su velocidad de degradación deberá ser compatible con la formación y remodelación del hueso, además de que los productos de su degradación no sean tóxicos (Maisani, 2017). Por lo tanto, los materiales que sintetizamos en este trabajo son una opción para rellenar fracturas óseas al no presentar citotoxicidad, hemólisi ni apoptosis.

Monómeros	Biodegradable	Nanopartículas (nm)	Poro (µm)	Inter- conectividad	Células	Observaciones	Referencia
CL- LA	~	NHA 580	nd	~	BMSCs	Proliferación significativa respecto al control (cajas petri) de BMSCs y mineralización del PolyHIPE.	Hu et al. (2015)
LLA GA	~	gNHA (irregulares ,580)	nd	~	BMSCs	Proliferación significativa respecto al control (cajas petri) de BMSCs y mineralización del PolyHIPE.	Hu et al. (2014)
ТМРТМР DPEHA	No	HA (nd) SrHA (nd)	58 ± 23	~	MG63	La adhesión y proliferación de MG63 fue mayor con el PolyHIPE con SrHA. La expresión de ALP en los polyHIPEs con HA o SrHA fue menor comparado con los PolyHIPEs sin HA o SrHA.	Lee et al. (2017)
PFDMA	√	NHA (<200) ACP (<150)	≈10	×	MSC	Los polyHIPEs promueven la viabilidad celular de MSC y la diferenciación osteogénica.	Robison <i>et al</i> . (2016)
Estireno y DVD	No		40-80	~	hES-MP	La topología del polyHIPE tiene un efecto en la diferenciación osteogénica.	Viswanathan <i>et al</i> . (2015)
CL	~		5-100	~	HF	Las células se adhirieron a la superficie del polyHIPE.	Busby <i>et al</i> . (2001)
LA	✓	NHA (20-70)	10-100	No	BMSCs	Las células se adhirieron, crecieron y proliferaron en los polyHIPEs.	Hu <i>et al</i> . (2016)
IBOA	×	NHA (nd)	20-50	×		La adición de NHA aumentó el módulo de Young y la máxima fuerza de compresión de los polyHIPEs	Wang <i>et al</i> . (2016)
PEGDA/PEGM A	~	Kaolin (10 µm)	0.75	~	HDFs	Los polyHIPEs no son tóxicos para los HDFs.	Streifel <i>et al</i> . (2018)
ММ	~	NHA (150- 200 nm)	1.5 a 41	~		El poro de los polyHIPEs se puede ajustar con la concentración del surfactante	Zhou <i>et al</i> . (2012)

 Tabla 6. Resumen de las características de algunos de los poliHIPEs citados en este trabajo.

CL: caprolactona, LA: ácido láctico, LLA: lactida,GA Ácido glicólico, gNHA: NHA con poly(ácido L-áctico), BMSCs: Células madre mesenquimales de ratón, hES-MP: células embrionarias humanas, H.F. fibroblastos humanos, HDFs: fribloblastos dérmicos humanos HA: hidroxiapatita, NHA: nanopartículas de HA, SrHA: hidroxiapatita modificada con strontium, ACP: nanopartículas de fosfato de calcio, TMPTMP: trimetilolpropano tris (3- mercaptopropionato), DPEHA: dipentaeritrol penta/hexa acrilato, PFDMA: propileno fumarato dimetacrilato, CNCs: cristales de celulosa, DVD: divinil beceno, IBOA: acrilato de isobornilo, PEGDA: polietilenglicol diacrilato, PEGMA: polietilenglicol metacrilato, MM: metil meristato, nd: no determinado.



Figura 41. Representación esquemática de la emulsión HIPE sintetizada en este trabajo.



Figura 42. Visualización 3D de la porosidad del poliHIPE pMMA-NHA.

En este trabajo se sintetizaron materiales porosos (poliHIPEs) preparados a partir de la polimerización por radicales libres de emulsiones utilizadas como plantillas. Se llevó a cabo la polimerización de 3 emulsiones con una fase interna altamente concentrada (HIPE), con una fracción de volumen de 0.80. La fase interna consiste en una mezcla eutéctica (DES), está compuesta de una sal de amonio cuaternaria (ChCl) y un donador de enlaces de hidrógeno (urea) con una relación ChCl: 2Urea. La fase continua estuvo constituida de un monómero (MMA, LA o SMA) entrecruzante (EDGMA o BDA), surfactante (Cithrol [®]) e iniciador (AIBN).

La formación del DES se describió a través de sus interacciones moleculares, en particular los enlaces de hidrógeno entre los diferentes grupos funcionales del ChCl y la urea. A través de un análisis por IR se observó que la estructura del ChCl no se perdió y junto con los resultados de H¹NMR se concluyó que no hubo reacción química entre el ChCl y la urea. El comportamiento térmico del DES mostró un punto de fusión de 21.3°C y nula descomposición en el rango de análisis (-60°C a 120°C). Además, la alta viscosidad (80° mPa a 60°C) del DES permite limitar los procesos de difusión en la HIPE y controlar la temperatura de polimerización en las emulsiones. Estas ventajas permiten que el DES se utilice como disolvente a temperatura ambiente y su alta viscosidad confiere una mayor estabilidad a las emulsiones comparada con las HIPEs con fases internas acuosas.

Después de recuperar el DES a través de una extracción Soxhlet con etanol, los resultados de SEM mostraron que los poliHIPEs tenían una porosidad interconectada con un tamaño de poro <15 μ m con rendimientos de polimerización mayores al 90%. Los resultados de micro-tomografía computarizada (μ –CT) mostraron la reconstrucción en 3D del poliHIPE pMMA-NHA, observando también la porosidad interconectada del poliHIPE. el porcentaje de porosidad fue de 68%, con un 0.018% de NHA y una superficie específica de 1.0 m²/m³. La distribución de los poros mostró que el área en promedio de éstos es de 374.3 μ m² y 714.6 μ m³.

La incorporación de NHA en los poliHIPEs se demostró con un análisis de difracción de rayos X y μ –CT. La modificación de los poliHIPEs con NHA no cambió el tamaño de poro con respecto a los poliHIPEs sin NHA, pero si disminuyó ≈50% el esfuerzo de compresión y el módulo elástico de los poliHIPEs.

Los estudios de biocompatibilidad demostraron que los poliHIPEs no son tóxicos para los HFF-1 y que también son seguros a nivel hematológico al no presentar porcentajes de hemólisis ≥ al 5%. Tanto el rendimiento de la polimerización como el lavado del poliHIPE para retirar la fase interna y los reactivos residuales minimizando esta citotoxicidad. La estructura porosa y el tamaño de poro de los poliHIPEs facilitó la adhesión de las células para su crecimiento. Los resultados de proliferación celular en HFF-1 y MC3T3-E1 mostraron una mayor proliferación celular comparado con el control (células sin andamio). En particular, los poliHIPEs con NHA (pMMA-NHA y pSMA-NHA) mostraron un incremento significativo en la proliferación de MC3T3-E1, por efecto de la superficie de éstos poliHIPEs, los cuales permitieron una mayor interacción con las células con la rugosidad de las paredes internas. Además, la forma y el tamaño de las NHA (esféricas, <200nm) utilizadas no mostraron citotoxicidad.

La expresión de la ALP no fue significativa a las 24 h sino hasta las 120 h (5 d). Se observó un incremento en la expresión de ALP en MC3T3-E1 y fue significativo (p<0.05) para pSMA-NHA y pLA-NHA respecto al control; determinando que la NHA promueven la actividad de la ALP. Por último, los resultados en la generación de ROS en HFF-1 y MC3T3-E1 corresponde con los resultados de proliferación celular.

Debido a los resultados obtenidos en la biocompatibilidad de los poliHIPEs, éstos pueden ser útiles en la ingeniería del tejido óseo, especialmente para rellenar huecos de fracturas. Nuestros resultados sugieren que, aunque el poliHIPE de SMA con NHA tuvo buenos resultados en los ensayos de proliferación y diferenciación en osteoblastos, los poliHIPEs de MMA (pMMA y pMMA-NHA) fueron los mejores caracterizados, además la adición de NHA no modificó la viabilidad celular de las células osteoblasticas y aunque disminuyeron las propiedades mecánicas del poliHIPE, éste puede ser manipulable para su implantación. Cabe resaltar que a las 24 h la expresión de la ALP fue mayor en pMMA-NHA en comparación con los otros poliHIPEs y el control pero que después disminuyó a las 120 h, indicando la posibilidad de que el poliHIPE esté promoviendo la mineralización de la matriz.

- Abbott, A. P, Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. 2003. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Chemical Comunications, 0, 70-71. doi: 10.1039/B210714G.
- Abbott, S. 2016. Surfactant Science: Principles and Practice.Book. Consultado el 4 de junio de 2018, de: https://www.stevenabbott.co.uk/practical-surfactants/the-book.php
- Abdollahi, M., Larijani, B., Rahimir, R. Salari, P. 2005. Role of oxidative stress in osteoporosis. Therapy, 2, 5, 787-796. doi: 10.1586/14750708.2.5.787.
- ACS. 2016. What is green chemistry?. Obtenido el 15 de junio de 2018, de: https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry.html
- Akay, G., Birch, M. A., Bokhari, M. A. 2004. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. Biomaterials, 25 (18), 3391-4000.
- Alonso, D., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, M., Ramón, J. 2016. Deep Eutectic Solvents: The Organic Reaction Medium of the Century. European Journal of Organic Chemistry, 612-632. doi: 10.1002/ejoc.201501197.
- Amini, A. Laurencin, C., Nukavarapu, S. 2012. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. Criticals Reviews in Biomedical Engineering, 40 (5), 363–408.
- Andiappan, M., Sundaramoorthy, S., Panda, N., Meiyazhaban, G., Winfred, S. B., Venkataraman, G.,
 Krishna, P. 2013. Electrospun eri silk fibroin scaffold coated with hydroxyapatite for bone tissue
 engineering applications. Progress in Biomaterials, 2 (6), 1-11. doi: 10.1186/2194-0517-2-6.
- Arai, M., Shibata, Y., Pugdee, K., Abiko, Y., Ogata Y. 2007. Effects of Reactive Oxygen Species (ROS) on Antioxidant System and Osteoblastic Differentiation in MC3T3-E1 cells. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 59 (1), 27-33. doi: 10.1080/15216540601156188.
- Arakaki, N., Yamashita, A., Niimi, S., Yamazaki, T. 2013. Involvement of reactive oxygen species in osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells accompanied by mitochondrial morphological dynamics. Biomedical Research, 34 (3), 161-166.
- Atak, H., Buyuk, B., Huysal, M., Isik, S., Senel, M., Metzger, W. Y, Cetin, G. 2017. Preparation and characterization of amine functional nano-hydroxyapatite/chitosan bionanocomposite for bone tissue engineering applications. Carbohydrate Polymers, 164, 200-213. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.100.
- Atashi, F., Modarressi, A., Pepper, M. S. 2015. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. Stem cell and development, 24 (10), 1150-1163. doi: 10.1089/scd.2014.0484.
- Atala, A., Kasper, F.K, Mikos, A., 2012. Engineering Complex Tissues. Tissue Engineering, 4 (160), 1-10. doi: 10.1126/scitranslmed.3004890.
- ATTC. 2011. MTT Cell Proliferation Assay. Consultado del 01 de junio de 2018, de: https://www.atcc.org/~/media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx.

- Barbetta, A., Cameron, N. R., Cooper, S. J. 2000. High internal phase emulsions (HIPEs) containing divylbenzene and 4-vinylbenzyl chloride and the morphology of the resulting PolyHIPE materials. Chemical Communication, 0, 221-22. doi: 10.1039/A909060F.
- BIOSOURCE, Invitrogen. 2008. AlamarBlue Assay. Consultado el 01 de junio de 2018, de: <u>https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-</u> 1100 TI%20alamarBlue%20Rev%201.1.pdf.
- Brauer, A., Pohlemann, T., Metzger, W. 2016. Osteogenic differentiation of immature osteoblasts: Interplay of cell culture media and supplements. Biotechnic & Histochemistry, 91 (3), 161-169. doi: 10.3109/10520295.2015.
- Busby, W., Cameron, N. R., Jahoda, A. B. 2001. Emulsion –Derived Foams (PolyHIPEs) Containing Poly (Ecaprolactone) as Matrixes for Tissue Engineering. Biomacromolecules, 2 (1), 154-164.
- Byrne, P. F., Jin, S., Paggiola, G., Petchey, M., Clark, H., Farmer, J., Hunt, A., McElroy, R., Sherwood, J. 2016.
 Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. Sustainable Chemical Processes, 4 (7), 1-24. doi: 10.1186/s40508-016-0051-z.
- Cameron, N. R., Sherrington, D.C. 1996. High internal phase emulsions (HIPEs) Structure, properties and use in polymer preparation. Biopolymers Liquid Crystalline Polymers Phase Emulsion. Advances in Polymer Science, 126, 163-214. doi: 10.1007/3-540-60484-7_4.
- Cameron, N. R. 2005. High internal phase emulsion templating as a route to well-defined porous polymers. Polymer 46, 1439-1449. doi: 10.1016/j.polymer.2004.11.097.
- Capello, C., Fischer, U., Hungerbühler, K. 2007. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. Green Chemistry, 9, 927-934. doi: 10.1039/B617536H.
- Carranza, A., Pojman, J. A., Mota-Morales, J. D. 2014. Deep-eutectic solvents as a support in the nonaqueous synthesis of macroporous poly(HIPEs). Royal Society of Chemistry Advances, 4, 41584 –41587. doi: 10.1039/C4RA06778A.
- Carranza, A., Pérez-García, M. G., Song, K., Jeha, G. M., Diao, Z., Jing, R., Bogdanchikova N., Soltero A. F., Terrones M., Wu, Qinglin, Pojman, J., A., Mota-Morales, J. D. 2016. Deep-eutectic solvents as MWCNT Delivery Vehicles in the Synthesis of Functional Poly(HIPE) Nanocomposites for Applications as Selective Sorbents. ACS Applied Materials and Interfaces, 8 (45), 3195-31303. doi: 10.1021/acsami.6b09589.
- Carranza, A., Romero-Perez, D., Almanza Reyes, H., Bogdanchikova, N., Juarez-Moreno, K., Pojman, J. A., Velasquillo, C., Mota-Morales J. D. 2017. Nonaqueous Synthesis of Macroporous Nanocomposites Using High Internal Phase Emulsion Stabilized by Nanohydroxyapatite. Advanced Materials Interfaces, 4 (16), 1-7. doi: 10.1002/admi.201700094.
- Carranza, A., Song, K., Soltero-Martínez, J. F. A., Wu, Q., Pojman, J. A., Mota-Morales, J. D. 2016. On the stability and chemorheology of a urea choline chloride deep-eutectic solvent as an internal phase in acrylic high internal phase emulsions. Royal Society Chemistry Advances, 6, 81694-81702. doi: 10.1039/C6RA18931H.

82

- ChemSafetyPro. 2018. REACH Annex XVII: REACH Restricted Substance List 2018. Obtenido el 10 de junio de 2018 de: <u>http://www.chemsafetypro.com/Topics/EU/REACH_annex_xvii_REACH_restricted_substance_list.html</u>.
- Chen, Z., Klein, T., Murray, R. Z., Crawford, Chang, J., Wu, C., Xiao, Y. 2016. Osteoimmunomodulation for the development of advance bone biomaterials. Materials Today, 19 (6), 304-321.
- Clark, P., Carlos, F., Vazquez, J.L. 2010. Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico. Archives of Osteoporosis, 5, 9-17. doi: 10.1007/s11657-010-0042-8.
- Dalby, M. J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M. O., Herzyk, P., Wilkinson, C. D. W., Oreffo R. O.
 C. 2007. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. Nature materials, 6, 997-1003.
- Dillingham, E. O., Lawrence, W. H., Autian, J., Schmalz, G. 1983. Acrylate and methacrylate esters: Relationship of hemolytic activity and *in vivo* toxicity. Journal of Biomedical Materials Research, 17 (6), 945-957. doi: 10.1002/jbm.820170606.
- Dong, K., Liu, X., Dong, H., Zhang, X., Zhang, S. 2017. Multiscale Studies on Ionic Liquids. Chemical Reviews, 117 (10), 6636-3395. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00776.
- Dowling, D. P., Miller, I. S., Ardhaoui, M., Gallagher, W. M. 2011. Effect of Surface Wettability and Topography on the Adhesion of Osteosarcoma Cells on Plasma-modified Polystyrene. Journal of Biomaterials Applications, 26 (3), 327-347. doi: 10.1177/0885328210372148.
- Du, C., Zhao, B., Chen, X., Birbilis, N. Yang, H. 2016. Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid. Scientific Reports, 6,(29225) 1-14. Doi: 10.1038/srep29225.
- Dunstan, T. S., Fletcher, P. D. I., Mashinshi, S. 2012. High Internal Phase Emulsions: Catastrophic Phase Inversion, Stability and Triggered Destabilization. Langmuir, 28, 339-349. doi: 10.1021/la204104m.
- EPA. 2017. Green Chemistry. Obtenido el 15 de junio de 2018, de: https://www.epa.gov/greenchemistry
- FAO.2012. Clas II Special Controls Guidance Document: Polymethylmethacrylate (PMMA) Bone Cement-Guidance for Industry and FDA. Obtenido el 10 de junio de 2018, de: <u>https://www.fda.gov/MedicalDevices/ucm072795.htm</u>
- Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., Marrucho, I. M. 2014. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. ACS Sustainable Chemical and Engeenering, 2, 2416–2425. doi: 10.1021/sc500439w.
- Foss, A. C., Peppas, N. A. 2004. Investigation of the cytotoxicity and insulin transport of acrylic-based copolymer protein delivery systems in contact with caco-2 cultures. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 57 (3), 447-455. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.02.008.
- Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D., Simon, J. 2011. Immune responses to implants: A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. Biomaterials, 32 (28), 6692-6709. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.078.

- Gao, C., Peng, S., Feng, P., Shuai, C. 2017. Bone biomaterials and interactions with steam cells. Nature, 5, 1-32. doi: 10.1038/boneres.2017.59.
- Ge, X., Gu, C., Wang, X., Tu, J. 2017. Deep eutectic solvents (DESs)-derived advanced functional materials for energy and environmental applications: challenges, opportunities, and future vision. Journal of Materials Chemistry A, 5, 8209-8229. doi: 10.1039/C7TA01659J
- Ginzber, G M. B., Kafri, R. Kirschner, M. 2015. On being the right (cell) size. Science, 771, (6236), 1-7. doi: 10.1126/science.1245075
- GODT. 2017. Resumen. Obtenido el día 23 de mayo de 2018 de: http://www.transplant-observatory.org/.
- Gotvajn, Z., Kalčikova, G. 2017. Biotreatability of selected choline-based deep eutectic solvents. En: 15th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece, 31 agosto al 2 de septiembre.
- Groen, N., Tahmasebi, N., Shimizu, F., Sano, Y., Kanda, T., Barberi, D., Yuan, H., Habibovic, P., Van Blitterswijk, C. A., de Boer J. 2005. Exploring the Material-Induced Transcriptional Landscape of Osteoblasts on Bone Graft Materials. Advanced Healthcare Materials, 4, pp. 1691-1700. doi: 10.1002/adhm.201500171.
- Gui-Bo, Y., You-Zhu, Z., Shu-Dong, W., De-Bing S., Zhi-Hui, D., Wei-Guo, F. 2009. Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 93 (1), 158-163. doi: 10.1002/jbm.a.32496.
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Reyes, C. y Del Monte, F. 2009. Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures. Langmuir, 25 (10), 5509–5515. doi: 10.1021/la900552b.
- Gutiérrez, M. C., Rubio, F., Del Monte, F. 2010. Resorcinol-Formaldehyde Polycondensation in Deep Eutectic Solvents for the Preparation of Carbons and Carbon-Carbon Nanotube Composites. Chemistry of Materials, 22, 2711-2719. doi: 10.1021/cm9023502.
- Han, X., Courseaus, J., Khamassi, J., Norttrodt, N., Engelhardt, S., Jacobsen, F., Bierwisch, C., Meyer, W., Walter, T., Weisser, J., Jaeger, R., Bibb, R., Harris, R. 2018. Optimized vascular network by stereolithography for tissue engineered skin. International Journal of Bioprinting, 4, (2), 1-17. doi: 10.18063/ijb.v4i2.134.
- Hong, J. H., Madihaly, S. V. 2010. 3D Scaffold of Electrosprayed Fibers with Large Pore Size for Tissue Regeneration. Acta Biomaterials, 6 (12), 1-18. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.003.
- Hu, Y., Gao, H., Du, Z., Liu, Y., Yang, Y., Wang, C. 2015. Pickering high internal phase emulsion-base hydroxyapatite- poly (E-caprolactone) nanocomposite scaffolds. Journal of Materials Chemistry B, 3 (18), 3848-3857. doi: 10.1039/C5TB00093A.
- Huang, Y., Onyeri, S., Sieve, M., Moshfeghian, A., Madihally, S. V. 2005. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials, 26 (36), 7616-7627.
- Hu, Y., Gu, X., Yang, Y., Huang, J., Hu, M., Chen, W., Tong, Z., Wang, C. 2014. Facil fabrication of poly(Llactic acid)- grafted hydroxyapatite/ poly (lactic-co-glycolic acid) scaffolds by pickering high

internal phase emulsion templates. Applied materials & interfaces, 6 (19), 17166-17175. doi: 10.1021/am504877h.

- Hu, Y. Q., Yin, S. W., Zhu, J. H., Qi, J. R., Guo, J., Wu, L. Y., Tang, C. T., Yang, X. Q. 2016. Fabrication and characterization of novel Pickering emulsions and Pickering High internal emulsions stabilized by gliadin colloidal particles. Food Hydrocolloids, 6, 300-310.
- Huang, Y., Onyeri, S., Sieve, M., Moshfeghian, A., Madihally, S. V. 2005. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. Biomaterials, 26 (36), 7616-7627.
- Invitrogen. 2006. Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit. Consultado el 01 de junio de 2018, de: http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V12883.
- Ishihara, M., Fujisawa, S. 2009. A structure-activity relationship study on the mechanisms of methacrylateinduced toxicity using NMR chemical shift of B-carbon, RP-HPLC log P and semiempirical molecular descriptor. Dental Materials Journal, 28 (1), 113-120. doi: 10.4012/dmj.28.113.
- Iyer, P., Walker, K. J., Madihally, S. V. 2011. Increased Matrix Synthesis by fibroblasts with Decreased Proliferation on Synthetic Chitosan-Gelatin Porous Structures. Biotechnology and Bioengineering, 109 (5), 1314-1325. doi:10.1002/bit.24396.
- Jaganjac, M., Milkovic, L., Cipak, A., Mozetic, M., Reek, N., Zarkovic, N., Vesel A. 2012. Cell Adhesion on Hydrophobic polymer surfaces. Materiali in Technologije, 46, 53-56.
- James, L. (Ed.) 1998. Fundamentals of NMR. Consultado el 10 de mayo de 2018, de: <u>https://qudev.phys.ethz.ch/phys4/studentspresentations/nmr/James_Fundamentals_of_NM</u> <u>R.pdf</u>
- Keuleers, R., Desseyn, H. O., Rousseau, B., Van Alsenoy, C. 1999. Vibrational Analysis of Urea. The Journal of Physical Chemistry A, 103, 4621-4630. Doi: 10.1021/jp984180z.
- Kim, E., Hyun, E., A., Dvir, T., Kim, D-H. 2014. Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering and regenerative medicine. International Journal of Nanomedicine, 9, 1-5. doi: 10.2147/IJN.S61212.
- Kubisa, P. 2009. Ionic liquids as solvents for polymerization processes—Progress and Challenges. Progress in Polymer Science, 34, 1333-1347. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2009.09.001.
- Lee, A., Langford, C. R., Rodríguez-Lorenzo, L. M., Thissen, H., Cameron, N. R. 2017. Bioceramic nanocomposite thiol-acrylate polyHIPE scaffolds for enhanced osteoblastic cell culture in 3D. Biomaterials Science, 5, 2035-2047. doi: 0.1039/C7BM00292K.
- Li, C-W., Wang, G-J. 2012. MEMS manufacturing techniques for tissue scaffolding devices. En: Bhansali, S., Vasudev A. (Eds), MEMS for biomedical Applications. Woohead Publishing, Phiadelphia. Pp 193-194.
- Li, X., Row, K. H. 2016. Development of deep eutetic solvents applied in extraction and separation. Journal of Separation Science, 39 (18), 3505-20 doi: 10.1002/jssc.201600633.
- Liu, Y., Luo, D., Wang, T. 2016. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. Materials Views, 12 (34), 1-22. doi: 10.1002/smll.201600626.

- Luna, D. 2003. El ININ produce huesos desmineralizados. Consultado el día 2 de agosto de 2018 de http://inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/HUESO.pdf.
- Livshin, S., Silverstein, M. S. 2007. Crystallinity in Cross-Linked Porous Polymers from High Internal Phase Emulsions. Macromolecules, 40, 6349-6354. doi: 10.1021/ma071055p.
- Loh, Q. L., Choong, C. 2013. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. Tissue Engineering, part B, 19 (6), 485-501. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437.
- Maisani, M., Pezzoli, D., Chassande, O., Mantovani, D. 2017. Cellularizing hydrogel-based scaffolds to repair bone tissue: How to create a physiologically relevant micro-environment. Journal of Tissue Engineering, 8, 1-26. doi: 10.1177/2041731417712073.
- Malvern- Panalytical. 2018. Reómetros. Obtenido el día 18 de mayo de 2018, de: https://www.malvernpanalytical.com/es/products/category/rheometers.
- Mengmeng, L., Wenwen, L., Jiashu, S., Yunlei X., Jidong W., Wei Z., Wenfu Z., Deyong H., Shiyu D., Yun-Ze, L., Xingyu J. 2013. Culturing Primary Human Osteoblasts on Electrospun Poly(lactic-co-glycolic acid) and Poly(lactic-co-glycolic acid)/Nanohydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. ACS Applied Materials & Interfaces, 5 (13), 5921-5926. doi: 10.1021/am401937m
- Mbous, P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, F., Hashim, A., Looi, Y. 2017. Applications of Deep Eutectic Solvents in Biotechnology and Bioengineering—Promises and Challenges. Biotechnology Advance, 35,2, 105-134. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.006
- Mjalli, F. S., Naser, J. 2015. Viscosity model for choline chloride-based deep eutectic solvents. Asia-Pacific Journal of Chemical . Engineering, 10, 273–281. doi: 10.1002/apj.1873.
- Molecular Probes. 2005. MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging (M36008).Consultadoel01dejuniode2018,de:http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M36008.
- Morrison, H. G., Sun, C. C., Neervannan, S. 2009. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles International Journal of Pharmaceutics, 13 (378), 136–139. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.05.039.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65 (1-2), 55-63.
- Mota-Morales, J. D., Gutiérrez, M. C., Sánches, I. C., Luna-Bárcenas, G., del Monte, F. 2011. Frontal polymerizations carried out in deep-eutectic mixtures providing both the monomers and the polymerization medium. Chemical Communication, 47, 5328-5330. doi: 10.1039/C1CC10391A.
- Mota-Morales, J. D., Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Elizalde-Peña, E. A., Pojman, J. A., del Monte, F., Luna-Bárcenas, G. 2013^a. Deep Eutectic Solvents as Both Active Fillers and Monomers for Frontal Polymerization. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 51 (8), 1-7. doi: 10.1002/pola.26555.
- Mota-Morales, J. D., Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Jiménez, R., Santiago, P., Sánches, I. C., Terrrones, M., Del Monte, F., Luna-Bárcenas, G. 2013b. Synthesis of macroporous poly(acrylic acid)–carbon

nanotube composites by frontal polymerization in deep-eutectic solvents. Journal of Materials Chemistry A, 1, 3970-3976. doi: 10.1039/C3TA01020A.

- Mota-Morales, J. D., Sánchez-Leija, R., Carranza, A., Pojman, J. A., del Monte F., Luna-Bárcenas G. 2018. Free-radical polymerizations of and in deep eutectic solvents: Green synthesis of functional materials. Progress in Polymer Science, 78, 139-153. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.09.005.
- Nath, S., Kalmodia, S., Basu, B. 2010. Densification, phase stability and in vitro biocompatibility property of hydroxyapatite-10 wt% silver composites. Journal of Mater Science: Materials in Medicine, 21, 1273–1287. doi: 10.1007/s10856-009-3939-2.
- O'Brien, F. J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials today, 14 (3), 88-95. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- Oh, S., Brammer, K. S, Julie, Li, Y. S., Teng, D., Engler, A. J., Chien, S., Jin S. 2009. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106 (7), 2130-2135. doi: 10.1073/pnas.0813200106.
- Olivier-Bourbigou, H., Magna, L. Y., Morvan, D. 2010. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. Applied Catalyst A: General, 373, 1-56. doi: 10.1016/j.apcata.2009.10.008.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. Obtenido el 20 de agosto de 2017 de: <u>http://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/es/</u>
- Owen, R., Sherorne, C., Paterson, T., Green, N. H., Reilly, C. G., Claeyssens, F. 2016. Emulsion templated scaffolds with tunable mechanical properties for bone tissue engineering. Journal of the mechanical Behaviour of Biomedical Materials, 54, 159-172. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.09.019.
- Park, J., Gerber, M., Babensee, J. 2014. Phenotype and polarization of autologous t cells by biomaterialtreated dendritic cells. Journal of Biomedical Materials Research part A, 103, 170–184. doi: 10.1002/jbm.a.35150.
- Pérez, R. A., Won, J. E., Knowles, J. C., Kim, H. W. 2012. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. Advanced Drug Delivery Reviews, 65 (4), 471-496. doi: 10.1016/j.addr.2012.03.009.
- Pérez-García, M. G., Carranza, A., Puig, J. E., Pojman, J. A., del Monte F., Luna-Bárcenas G., Mota-Morales J. D. 2015. Porous monoliths synthesized via polymerization of styrene and divinyl benzene in nonaqueous deep-eutetic solvent-based HIPEs. RSC Advances, 5, 23255-23260. doi: 10.1039/C5RA02374B.
- Perkins, S. L., Painter, P. C. M. 2013. Molecular Dynamic Simulations and Vibrational Analysis of an Ionic Liquid Analogue. The Journal of Physical Chemistry. B, 117 (35), 10250-10260. doi: 10.1021/jp404619x.
- Perkin Elmer.2014. Differential Scanning Calorimetry (DSC). Consultado el día 16 de mayo de 2018, de: <u>https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-</u> 74542GDE DSCBeginnersGuide.pdf

- Promocell. 2018. Osteoblast Differentiation and Mineralization. Consultado el día 15 de julio de 2018, de: https://www.promocell.com/downloads/application-notes/
- Radošević, K., Cvtetko, M., Gaurina, V., Grgas, D., Dragčiević, L., Redovniković, I. 2015. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. Ecotoxicology and Environmental Safety Journal, 112, 46-53. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
- Robison, J. L., McEnery, M. A. P., Pearce, H., Whitely, M. E., Munoz-Pinto, D. J., Hahn, M. S., Li, H., Sears, N. A., Cosgriff-Hernandez, E. 2016. Osteoinductive PolyHIPE Foams as Injectable Bone Grafts. Tissue Engineering & Regenerative Medicine, 22, 5, 403-414. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0370.
- Ross, S., Yooyod, M., Limpeanchob, N., Mahasaranon, S., Suphrom, N., Ross, G. M. 2017. Novel 3D porous semi-IPN hydrogel scaffolds of silk sericin and poly(N-hydroxyethyl acrylamide) for dermal reconstruction. Express Polymer Letters, 11, (9), 719-730. doi: 10.3144/expresspolymlett.2017.69.
- Sánchez-Leija, R. J., Pojam, J. A., Luna-Bárcenas, G., Mota-Morales, J. D. 2014. Controlled release of lidocaine hydrochloride from polymerized drug-based deep-eutectic solvents. Journal of Materials Chemistry B, 2, 7495-7501. doi:10.1039/C4TB01407C.
- Schwab, M. G., Senkovska, I., Rose, M., Klein, N., Koch, M., Pahnke, J., Jonschker, G., Schmithz, B., Hirscher, M., Kaskel, S. 2009. High surface are polyHIPEs with hierchical pore system. Soft Matter, 5, 1055-1059. doi: 10.1039/B815143A.
- Shafiee, A., Atala, A. 2017. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. Annual Review of Medicine, 68, 29–40. doi: 10.1146/annurev-med-102715-092331.
- Shi, Z., Huang, X., Cai, Y., Tang, R., Yang, D. 2009. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. Acta Biomaterialia, 5 (1), 338-345.
- Silverstein, M. S. 2014. Emulsion-templated porous polymers: A retrospective perspective. Polymer, 55, 304-320. doi: 10.1016/j.polymer.2013.08.068.
- Sittampalam, G. S. (Ed.) 2004. Assay Guidance Manual. Consultado el 5 de mayo de 2018, de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/.
- Smith, B. 1999. The Basics of Infrared Absorbance. En: C. Smith (Ed). Infrared Spectral Interpretation: a systematic approach. CRC Press, Florida. pp. 2-7.
- Smith, L. E., Abbot, P. A., Ryder, S. K., 2014. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. Chemical Reviews, 114, 11060-11082. doi: 10.1021/cr300162p.
- Sözen, T., Özışık, L., Başaran, N. 2016. An overview and management of osteoporosis. Europan Journal of Rheumatology, 4, pp 46-56. doi: 10.5152/eurjrheum.2016.048.
- Streifel, B. C., Lubdin, J. G., Sanders, A. M., Gold, K. A., Wilems, T., Williams, S. J., Crossgrift-Hernández, E., Wyne J. H. 2018. Hemostatic and Absorbent PolyHIPE-Kaolin Composites for 3D Printable Wound Dressing Materials. Macromolecular Bioscience, 18 (15), 1-10. doi: 10.1002/mabi.201700414.
- Tanni, H., Hashimoto, K. 1982. Structure-Toxicity Relationship of Acrylates and Methacrylates. Toxicity Letters, 11, 125-129. doi: 10.1016/0378-4274(82)90116-3.

- Van der Heide, D. J., Verbraeken, B., Hoogenboom, R., Dargaville, T. R., Hickey, D. K. 2017. Porous poly (2oxaline) scaffolds for developing 3D primary human tissue culture. Biomaterials and Tissue Technology, 1, 1-5. doi: 10.15761/BTT.1000104.
- Venkatesan, J., Kim, S-J. 2014. Nano-Hydroxyapatite Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering A Review. Journal of Biomedical Nanotechnology, 10, 3124–3140.
- Viswananthan, P., Ondeck, M., Chirasatitsin, S., Ngamkhan, K., Reilly, G. C., Engler, A. J., Battaglia, G. 2015.
 3D surface topology guides stem cell adhesion and differentiation. Biomaterials, 52, 140-147. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.034.
- Wiles, K., Fishman, J., De Coppi, P., Birchall, M. 2016. The Host Immune Response to Tissue Engineered Organs: Current Problems and Future Directions. Tissue Engineering: Part B, 22, 208-219. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0376.
- Wang, A. J., Paterson T., Owen R., Sherborne C., Dugan J., Li J. M., Claeyssens, F. 2016. Photocurable high internal phase emulsions (HIPEs) containing hydroxyapatite for additive manufacture of tissue engineering scaffolds with multi-scale porosity. Materials Science and Engineering C, 6, 51-58. doi: 10.1016/j.msec.2016.04.087.
- Wang, B., Lin, Q., Shen, C., Tang, J., Han, Y., Chen H. 2014. Hydrophobic modification of polymethyl methacrylate as intraocular lenses materials to improve the cytocompatibility. Journal of Colloid and Interfaces Science, 1 (431), 1-7. doi: 10.1016/j.jcis.2014.05.056.
- Williams, D.F. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials, 29, 2941-2953. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- Wilson, C., Clegg, R. E., Leavesley, D. Pearcy, M. J. 2005. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review, Tissue Engineering 11, 1-18. Doi: 10.1089/ten.2005.11.1
- Womba, H., Jordana, V., N. 2016. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review. Tissue Engineering Part B: Reviews, 22, 101-113. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0535
- Yadav, A., Pandey, S. 2014. Densities and Viscosities of (Choline Chloride + Urea) Deep Eutectic Solvent and Its Aqueous Mixtures in the Temperature Range 293.15 K to 363.15 K. Journal of. Chemical and Engineering Data, 59, 2221–2229. doi: 10.1021/je5001796.
- Yoshii, E. 1998. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. Journal of Biomedical Materials Research, 37 (4), 517-524. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19971215)37:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-5.
- Yousefi, A. M, James, P. F., Akbarzadeh, R., Subramanian, A., Flavin, C., Oudadesse, H., 2016. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. Stem Cells International, 2016, 1-13. doi: 10.1155/2016/6180487.
- Yue, D., Jia, Y., Yao, Y., Sun, J., Jing, Y. 2012. Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea. Electrochimica Acta, 65, (30), 30– 36. doi: 10.1016/j.electacta.2012.01.003.

- Xu, Z., Liu, C., Wei, J., Sun, J. 2011. Effects of four types of hydoxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. Journal of Applied Toxicology, 32 (6), 429-435. doi: 10.1002/jat.1745.
- Zhang, Q., Vigier, K., Royer, S., y Jérôme, F. 2012. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. Chemical Society Reviews, 41, 7108-7146. doi: 10.1039/C2CS35178A.
- Zhang, L., Wu, D., Chen, Y., Wang, X., Zhao, G., Wan, H., Huang, C. 2009. Surface modification of polymethyl methacrylate intraocular lenses by plasma for improvement of antithrombogenicity and transmittance. Applied Surface Science, 255 (15), 6840-6845. doi: 10.1016/j.apsusc.2009.03.029.
- Zhao, B.Y., Xu, P., Yang, F.X., Wu, H., Zong, M. H., Lou, W.Y. 2015. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride : Characterization and Application to the Extraction of Rutin from Sophora japonica. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 3, 2746-2755. doi: 10.1021/acssuschemeng.5b00619.
- Zhou, S., Bismarck, A., Steinke, J. H. 2012. Interconnected macroporous glycidyl methacrylate-grafted dextran hydrogels synthesised from hydroxyapatite nanoparticle stabilised high internal phase emulsion templates. Journal of Materials Chemistry, 36(22), 18824-18829. doi: 10.1039/C2JM33294A.