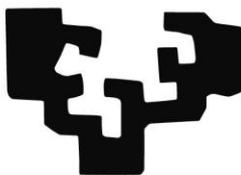


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Andamios Magnéticos

Para Aplicaciones Biomédicas

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

M^a Blanca Valle García

Dirigida por:

Dra. Esperanza Díaz Tajada

Dr. José Manuel Barandiaran García

Leioa, Mayo 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a Patricia Lazpita por tu gran ayuda y apoyo recibido, durante todos estos años.

A mis directores Esperanza Díaz y José Manuel Barandiaran, gracias por vuestra dedicación y capacidad para guiarme.

A mis compañeros de laboratorio Iban e Igor por la a ayuda que me habeís prestado cuando la he necesitado. No me puedo olvidar de agradecer a Itsaso por los ánimos que me has dado, siempre con una sonrisa.

Agradezco enormemente a Iñaki Orue y Loli Martín, vuestra ayuda ha hecho que lo difícil fuera mucho más fácil.

A mis padres y a mi hermano, que me lo habeis dado todo.

A Oihane, Unax y Jon, que os voy a decir, sin vosotros, no hubiera llegado al final de esta larga andadura. Gracias por estar ahí, siempre que os he necesitado, gracias por vuestro ánimo incondicional. Y perdonar por ese tiempo que no os he podido dedicar, sobre todo estos últimos meses.

Por último, quiero agradecer al equipo técnico de SGIKer (UPV/EHU)

RESUMEN

El objetivo de esta tesis ha sido fabricar mediante la técnica de separación de fases inducida térmicamente o TIPS (*Thermally Induced Phase Separation*), andamios magnéticos con una alta porosidad e interconexión, para aplicaciones temporales en medicina:

- liberación de fármacos
- soportes temporales en los que las células pueden crecer y formar tejidos.
- hipertermia

Esta técnica ha sido eficaz en la obtención de soportes tridimensionales de polímeros bioabsorbibles y biocompatibles (PCL o PLLA), demostrando ser muy versátil en la creación de andamios porosos incorporando nanopartículas magnéticas (hidroxiapatita dopada con hierro o magnetita) en un amplio rango de composiciones.

Mediante la adición de nanopartículas magnéticas hemos logrado funcionalizar la superficie de nuestros andamios de PCL y PLLA aumentando la hidrofobicidad; mediante la adición de nanopartículas (nHAFé y nFe₃O₄) con un fuerte carácter hidrofílico aumentando su capacidad de interactuar bioespecíficamente con células.

Hemos caracterizado y estudiado la degradación *in vitro* en PBS a temperatura fisiológica de estos soportes porosos mediante diversas técnicas (SEM, FTIR, DSC, VSM, GPC...). No se observó, ni pérdida importante de peso en las muestras, ni disminución considerable de la T_g durante la degradación *in vitro*. La adición de nanopartículas ocasionó una reducción en el tamaño de poro del andamio, disminuyendo el ratio de degradación durante el periodo de incubación

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	III
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Materiales para aplicaciones médicas. Citotoxicidad. Ensayo MTT. Biocompatibilidad. Degradación.....	2
1.1.1.- Materiales para Aplicaciones Médicas.....	2
1.1.2.- Citotoxicidad. Ensayo MTT.....	5
1.1.3.- Biocompatibilidad.....	7
1.1.4.- Degradación.....	7
1.2.- Biomateriales poliméricos.....	11
1.2.1.- Poliésteres.....	13
1.2.1.1- Poli-L-lactida (PLLA).....	13
1.2.1.2.- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL).....	16
1.3.- Fundamentos de magnetismo. Nanopartículas magnéticas y aplicaciones biomédicas.....	18
1.3.1.- Fundamentos de magnetismo.....	18
1.3.2.- Nanopartículas magnéticas y aplicaciones biomédicas..	27
1.4.- Planteamiento y objetivos de la tesis.....	32
2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.1.- Síntesis de nanohidroxiapatita dopada con hierro (nHAFe).....	35
2.2.- Caracterización de nanopartículas magnéticas.....	37
2.3.- Fabricación de soportes porosos.....	39
2.4.- Caracterización de soportes porosos.....	45
2.5.- Estudio de citotoxicidad <i>in vitro</i>	48

2.6.- Estudio de degradación <i>in vitro</i>	49
3.- ESTUDIO DE nHAFe.....	51
3.1.- Difracción de rayos X.....	51
3.2.- Morfología de las partículas mediante TEM y SEM.....	54
3.3.- Propiedades Magnéticas (VSM).....	55
3.4.- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)....	57
4.- CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PCL-NPMs. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN <i>IN VITRO</i> .	61
4.1.- Sistema PCL-nHAFe. Estudio de degradación <i>in vitro</i>	61
4.1.1.- Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	62
4.1.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopía Infrarroja, FTIR	66
4.1.3.- Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	73
4.1.4.- Propiedades magnéticas (VSM).....	80
4.1.5.- Absorción de agua.....	82
4.1.6.- Variación del pH.....	84
4.1.7.- Pérdida de masa y peso molecular.....	85
4.2.- Sistema PCL-nFe ₃ O ₄ . Estudio de degradación <i>in vitro</i>	86
4.2.1.- Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	87
4.2.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopía Infrarroja, FTIR	90
4.2.3.- Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido	

(DSC).....	92
4.2.4.- Propiedades magnéticas (VSM).....	97
4.2.5.- Absorción de agua.....	98
4.2.6.- Variación del pH.....	100
4.2.7.- Pérdida de masa y peso molecular.....	101
5.- CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PLLA-NPMs. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN.....	103
5.1.- Sistema PLLA-nHAFé. Estudio de degradación <i>in vitro</i>	104
5.1.1.- Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	104
5.1.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopia Infrarroja, FTIR.....	108
5.1.3.- Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	111
5.1.4.- Propiedades magnéticas (VSM).....	117
5.1.5.- Absorción de agua.....	118
5.1.6.- Variación del pH.....	120
5.1.7.- Pérdida de masa y peso molecular.....	121
5.2.- Sistema PLLA-nFe ₃ O ₄ . Estudio de degradación <i>in vitro</i>	124
5.2.1.- Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	124
5.2.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopia Infrarroja, FTIR.....	127
5.2.3.- Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	129

5.2.4.- Propiedades magnéticas (VSM).....	133
5.2.5.- Absorción de agua.....	135
5.2.6.- Variación del pH.....	136
5.2.7.- Pérdida de masa y peso molecular.....	137
6.- ESTUDIO PRELIMINAR BIOCOMPATIBILIDAD IN VITRO. CITOTOXICIDAD.	
ENSAYO MTT.....	139
7.- CONCLUSIONES.....	143
APENDICE 1.- MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	147
PUBLICACIONES.....	159
BIBLIOGRAFÍA.....	161

Capítulo 1

Introducción

La primera aplicación de biomateriales en medicina se produce en 1860 con la introducción de las técnicas quirúrgicas asépticas. A principios de 1900 se aplican las primeras placas metálicas con la finalidad de reparar roturas o fracturas óseas. Durante los siguientes años las aleaciones metálicas constituyen la única forma de biomateriales en uso. En la Segunda Guerra Mundial se produce un rápido avance en la ciencia de los polímeros, principalmente enfocado a las aplicaciones médicas. El polimetilmetacrilato (PMMA) fue uno de los primeros polímeros utilizados como material biomédico, aplicándose como material para reparar la córnea humana [1, 2].

Los polímeros no sólo reemplazaron a otros materiales en aplicaciones médicas, como la sustitución de los catéteres metálicos por polietileno, sino que abrieron el campo a otras nuevas aplicaciones antes difícilmente asequibles. Así, en 1950 se fabrica el primer corazón artificial, implantado en el cuerpo humano a finales de 1960.

En el transcurso de los últimos cincuenta años esta disciplina sufre un espectacular avance. El desarrollo de nuevas tecnologías así como el avance continuo que experimenta el conocimiento científico en este tiempo, hace posible extender la aplicabilidad de una amplia gama de materiales tanto naturales como sintéticos en todos los campos de la medicina moderna.

El término biomaterial deriva de la implantación de estos materiales en el seno de organismos vivos. Sin embargo no se establece una primera definición hasta 1986, en Chester (Reino Unido), considerando como un biomaterial aquel material no vivo usado como dispositivo médico y cuya finalidad es interactuar con un sistema biológico [3]. Esta primera definición, ampliamente discutida en diversos foros científicos, se desarrolla hasta llegar a una mucho más amplia surgida del consenso entre los diferentes especialistas en 1991 de nuevo en

Chester. A partir de entonces se considera como biomaterial cualquier material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo [4, 5, 6].

De este modo para que un biomaterial cumpla con las expectativas requeridas a su función, ha de cumplir una serie de requisitos como son poseer una biofuncionalidad específica, esto es, cumplir con la función para la que ha sido diseñado, presentando además una respuesta en términos de biocompatibilidad aceptable [7]. Esta última característica afecta además tanto al material en sí como a los productos derivados de la degradación físico-química de éste. La biocompatibilidad es sin embargo algo más complejo de evaluar. Esto se debe a que la respuesta biológica puede ser tomada en cuenta a distintas escalas, por ejemplo desde las células que componen el tejido adyacente hasta la respuesta inmunológica del paciente e incluso la pura supervivencia de éste.

Por último, ha de tenerse en cuenta el carácter multidisciplinar de la ciencia de los biomateriales ya que ésta engloba distintas técnicas y disciplinas, desde el diseño hasta la implantación final del material en el seno del organismo. El éxito de ésta, por consiguiente, involucra tanto a médicos como a ingenieros, químicos, biólogos y un largo etcétera de especialistas.

Existe una gran variedad de materiales aptos para su uso en aplicaciones biomédicas. La elección de uno u otro para una aplicación determinada viene condicionada por sus propiedades físico-químicas así como por la respuesta del material frente a la función para la que ha sido diseñado. Así, en unos casos se busca resistencia mecánica, como en implantes óseos, y en otros casos por ejemplo, una serie de propiedades químicas que les hacen aptos para actuar como soportes de liberación de fármacos, etc.

1.1- MATERIALES PARA APLICACIONES MÉDICAS. CITOTOXICIDAD Y ENSAYO MTT. BIOCAMPATIBILIDAD. DEGRADACIÓN

1.1.1. Materiales para aplicaciones médicas.

Desde finales del siglo XIX, y especialmente a lo largo del siglo XX, se ha producido un gran incremento en el número y variedad de polímeros, en sus

propiedades y aplicaciones, consiguiéndose desarrollar materiales de gran importancia en ingeniería. En los últimos años, la creciente demanda de materiales biodegradables para su utilización en el campo de la biomedicina ha incrementado el interés en la síntesis de productos con mejores prestaciones y propiedades.

Actualmente, existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico. Algunos de ellos son estables y se utilizan para aplicaciones permanentes, como el polimetilmetacrilato de metilo o el polietileno. Sin embargo, en los últimos años se han ido desarrollando los polímeros biodegradables, para aplicaciones temporales. Kulkarni y colaboradores introdujeron en los años 60, el concepto de material bioabsorbible [8, 9]. Estos materiales tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados dando lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste. Generalmente, este grupo está representado por los polímeros biodegradables, aunque existen ciertos materiales cerámicos que también son reabsorbibles.

Las principales características que han de considerarse en los materiales biodegradables para poder ser utilizados en aplicaciones clínicas son la velocidad de degradación, la resistencia mecánica del material y la seguridad de sus productos de degradación, es decir, no deben ser mutagénicos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos y, lógicamente, deben ser antisépticos, esterilizables y compatibles con el tejido receptor. Hoy en día, una gran parte de la investigación en el área de los polímeros para aplicaciones biomédicas se encuentra sobre todo dirigida al desarrollo de polímeros sintéticos.

Actualmente los biomateriales se definen como cualquier sustancia o combinación de sustancias diseñadas para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano [4, 5, 6].

Según su origen, los biomateriales pueden ser naturales o sintéticos.

En el caso particular de los biomateriales poliméricos, se puede hacer una clasificación según el tiempo que deben mantener su funcionalidad cuando se aplican como implantes quirúrgicos.

- En el primer grupo se incluyen todos aquellos implantes que deben tener un carácter permanente, como son los sistemas o dispositivos utilizados para sustituir parcial o totalmente a tejidos u órganos destruidos como consecuencia de una enfermedad o trauma. En este caso, se requieren materiales bioestables.
- El segundo grupo lo constituyen los biomateriales que deben mantener una funcionalidad adecuada durante un periodo de tiempo limitado, ya que el organismo humano puede desarrollar mecanismos de curación y regeneración tisular para reparar la zona o el tejido afectado. En estos casos se necesita un dispositivo de aplicación temporal, es decir, un material biodegradable [10].

Los materiales biodegradables pueden degradarse parcialmente por alteración de su estructura química lo cual conlleva una pérdida de propiedades específicas, o totalmente. En este último caso, generalmente se produce una mineralización completa con producción de CO₂, agua, sales minerales y biomasa, aunque también pueden quedar fragmentos (oligómeros) resistentes a la degradación.

Los soportes porosos tridimensionales o andamios (“scaffolds” en inglés), están siendo ampliamente estudiados, su función general es actuar como matriz extracelular (ECM) artificial, favoreciendo la transducción de señales fisiológicas, haciendo de guía estructural para el crecimiento celular, y permitiendo la difusión de metabolitos. Deben proporcionar un soporte mecánico biocompatible, que no induzca a una respuesta tisular adversa y que pueda sostener temporalmente carga mecánica. También debe tener una tasa de degradación apropiada, equivalente a la del proceso de regeneración del tejido. También se suele requerir una porosidad elevada y una relación área superficial/volumen alta para el anclaje celular y el crecimiento de neo-tejidos así como para un transporte uniforme de metabolitos. Además debe propiciar el reconocimiento biológico, de tal forma que dé soporte y promueva adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. Y deben constituir un lugar adecuado para el desarrollo de tejido vivo, que permita secuestrar y liberar factores morfogénicos.

El objetivo de la ingeniería tisular es el desarrollo de compuestos biológicos y biomateriales implantables en el organismo, con intención de reparar, mantener o mejorar la función de órganos y tejidos. Intervienen los andamios, las células y las señales, que si actúan coordinadamente consiguen la regeneración del tejido.

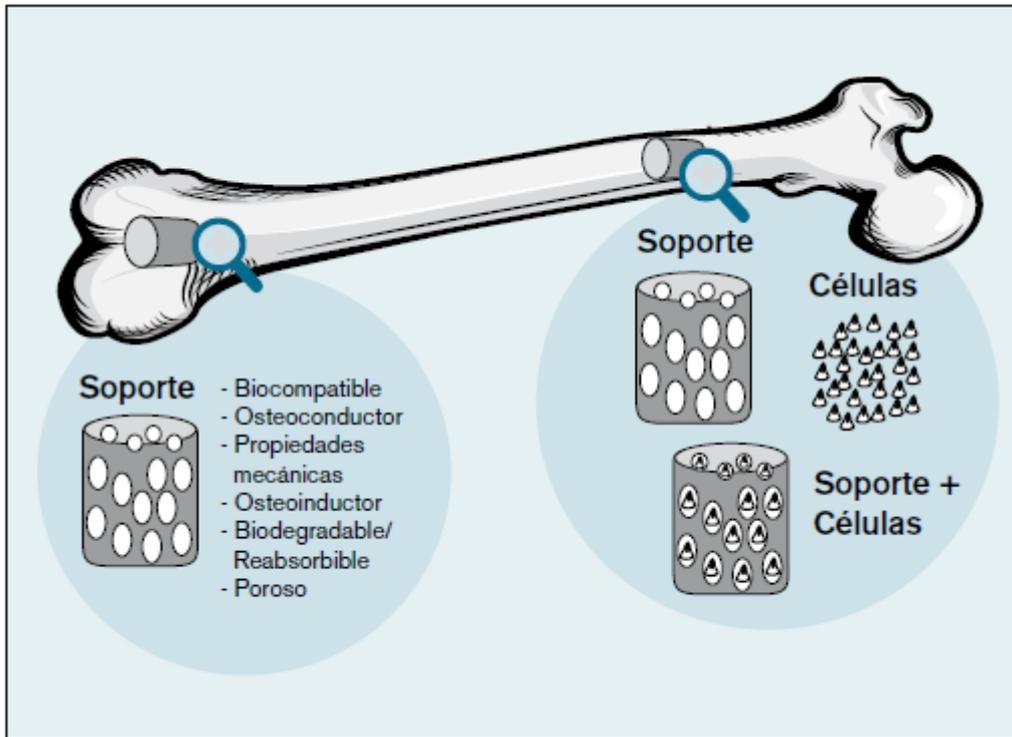


Figura 1.1.- Esquema de implante de andamio tomado de ref. [11] Vallet-Regí M. Tendencias en Biomateriales. EIDON 33 Plataforma de debate.

1.1.2.- Citotoxicidad. Ensayo MTT.

Los materiales empleados en medicina deben ser evaluados antes de su utilización clínica generalizada. Para ello se pueden realizar estudios *in vivo* e *in vitro*. Las pruebas *in vivo* sobre animales son caras, largas y de difícil control. Mientras que las pruebas de toxicología en ensayos *in vitro*, constituyen una alternativa para el conocimiento del comportamiento de materiales que van a ser utilizados en contacto con el organismo.

De forma habitual se realizan cultivos celulares, para poner en contacto diferentes líneas celulares con los materiales objetos de estudio a fin de

contabilizar en un periodo de tiempo determinado, las tasas de proliferación y muerte celular (toxicidad).

Podemos definir citotoxicidad, como una alteración de las funciones celulares básicas, de forma que se produce una modificación o daño, que puede ser detectada [12].

Un ensayo de citotoxicidad, es una prueba toxicológica que utiliza diversos mecanismos celulares conocidos, para conseguir interpretar los efectos que genera una determinada sustancia, objeto de estudio, en contacto con diversas líneas celulares u órganos. De esta forma se pueden medir alteraciones en cuanto a cambios estructurales de la célula, alteraciones en la proliferación celular o alteraciones en alguna de sus funciones. Se miden cambios en la integridad de la membrana, degradación de alguno de sus componentes, metabolismo, liberación de diversos constituyentes celulares, regulación iónica y división celular.

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro*, se utilizan para evaluar que un determinado producto o material no ejerza efectos tóxicos sobre células vivas.

Podemos encontrar diferentes tipos de ensayos para su medición, dentro de los cuales tenemos: ensayo de captación del rojo neutro, ensayo de enlazamiento al azul de kenacid y el que hemos utilizado para la realización de nuestra fase experimental, el ensayo conocido como MTT.

Ensayo MTT.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Denizot y Lang [13-14].

Se utiliza el método del MTT para determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales ó cultivos primarios de células normales.

1.1.3.- Biocompatibilidad.

La biocompatibilidad es la habilidad de un material para funcionar en una aplicación específica y con una respuesta apropiada del huésped. Según la normativa ISO14971:2012, un material biocompatible debe estar libre de todo riesgo. Así, la biocompatibilidad de los materiales engloba diversos parámetros, como la citotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, histocompatibilidad y la producción de efectos antimicrobianos. [15].

Los estudios de biocompatibilidad siguen generando cierto grado de controversia, debido a las limitaciones que tienen los estudios in vitro o en modelo animal, a la hora de extrapolar los resultados a nivel clínico. Por eso los estudios basados en la práctica clínica, así como los basados en bases de datos de los clínicos cada vez son de mayor importancia como complemento a los ensayos clínicos. No obstante, estos por si solos, también son de dudosa utilidad. Podemos decir por tanto, que hoy día debería de encontrarse un equilibrio entre ambos tipos de estudios para poder avalar el uso de materiales noveles en odontología [16].

1.1.4.- Degradación

Los materiales biodegradables con aplicaciones en medicina, una vez implantados deben mantener sus propiedades mecánicas hasta que hayan cumplido su función para, a partir de entonces, ser absorbidos y excretados por el organismo sin dejar trazas. Una simple hidrólisis química de los enlaces lábiles de las cadenas poliméricas es el mecanismo predominante de la degradación.

Hay tres tipos de biodegradaciones (Figura 1.2):

a).- Erosión o degradación en Bloque. Este proceso ocurre en dos fases:

- En la primera fase, el agua penetra en el material, atacando a los enlaces químicos de la fase amorfa y transformando las largas cadenas

poliméricas en fragmentos más cortos solubles en agua. Debido a que este fenómeno se produce inicialmente en la fase amorfa, hay una reducción en el peso molecular sin producirse pérdidas en las propiedades físicas, ya que la matriz del material está soportada por las regiones cristalinas. Tras la reducción del peso molecular se produce la pérdida de las propiedades físicas, mientras el agua continua fragmentando el material.

- En la segunda fase tiene lugar el ataque enzimático y la metabolización de los fragmentos, generando una rápida pérdida de la masa del polímero. Este tipo de degradación – en la que la velocidad con que el agua penetra en el material excede aquella en la cual el polímero es convertido en fragmentos solubles en agua - se llama erosión o degradación bulk. Todos los biomateriales comercialmente disponibles se degradan por este proceso.

b).- Erosión o degradación Superficial. Tiene lugar, cuando la velocidad a la que el agua penetra en el material es menor que la velocidad de conversión del polímero en fragmentos solubles. Se produce la reducción del espesor del material sin pérdida de peso.

c).-Erosión o degradación en bloque con autocatálisis. Los poliésteres alifáticos se degradan hidrolíticamente por el clivaje del enlace éster, esta ruptura puede ser promovida por enzimas o condiciones biológicas o una combinación de ambas. La hidrólisis es catalizada bien sea por ácidos o por bases, la escisión de cadenas genera la formación de grupos terminales carboxílicos que debido a su naturaleza ácida aumentarán la velocidad de la hidrólisis, este mecanismo se denomina auto-catálisis [17].

Los poliésteres son polímeros biodegradables porque poseen un grupo éster lábil en su cadena principal, en la práctica sólo los poliésteres alifáticos con segmentos metilénicos razonablemente cortos entre los enlaces éster se degradarán a una escala razonable de tiempo, por ejemplo, la polilactida se degrada a mayor velocidad que la policaprolactona [18].

Los poliésteres biodegradables son de gran interés en el campo biomédico que requieren de aplicaciones temporales, típicamente suturas, “andamios” y matrices de liberación de medicamentos [19].

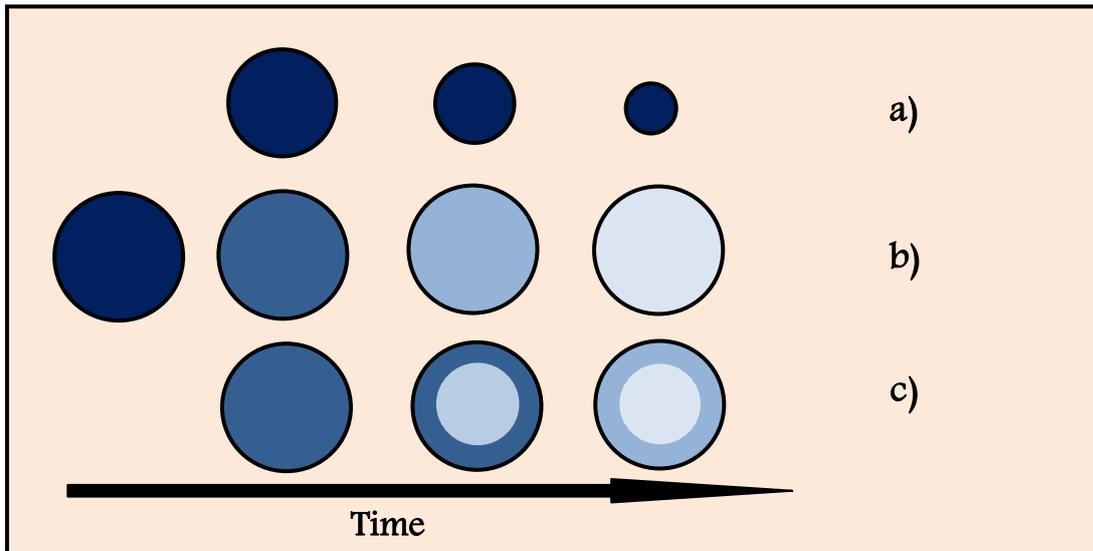


Figura 1.2. Representación Esquemática de Erosión Superficial a), Erosión en Bloque b), y Erosión en Bloque con autocatálisis c).

Torres y colaboradores [20] han estudiado que el mecanismo de degradación del PLA, depende del espesor de la muestra, se observa que para probetas de espesores superiores a 1mm la degradación es más rápida en el interior que en la superficie. Cuando el PLA se introduce en un medio acuoso, absorbe agua y comienza el clivaje autocatalizado del enlace éster. Luego, la degradación en la superficie se hace más lenta que en el interior debido al desprendimiento al medio de oligómeros ácidos solubles en agua y de ácido láctico, mientras que el material del interior permanece encapsulado, finalmente, toda la parte interior está compuesta por oligómeros solubles en agua por lo que se forman huecos, mientras que la superficie de degradación continúa degradándose lentamente.

La degradación de la polilactida, como un poliéster alifático, depende de su estructura, por la presencia de grupos hidrofílicos susceptibles a hidrólisis y al igual que todos los polímeros biodegradables, la biodegradación también depende de la morfología, de la cristalinidad y del peso molecular [21].

Estudios de degradación *in vitro* de andamios de PLLA-nanohidroxiapatita (nHA); en solución tampón fosfato salina (7.2 pH) a 37°C muestran que la adición de pequeñas cantidades de nHA disminuyen el ratio de degradación de los andamios [22].

La degradación hidrolítica de la PCL es muy lenta, especialmente en aquellos polímeros con alto peso molecular. Por ser la poli(ϵ -caprolactona) un material hidrofóbico, por su estructura (ω -hidroxiácido), por su alto peso molecular y por su porcentaje de cristalinidad se estima que tarda en degradarse totalmente de 2-4 años, dependiendo del peso molecular inicial del dispositivo o del implante [23-26].

En cuanto al peso molecular Henry y colaboradores [27] observaron una disminución lineal del peso molecular promedio en peso ($-M_w$) debida a la penetración del agua que ocasiona la hidrólisis del enlace éster, posteriormente la velocidad de pérdida del peso molecular disminuye debido a la reestructuración del material, ya que aumentan el número de grupos polares, lo cual favorece un aumento en el número de puentes de hidrógeno.

Diversos estudios muestran que el mecanismo de degradación que sigue es del mismo principio que para otros Poliésteres alifáticos, tales como PLA y PGA. Estudios *in vitro* de degradación de películas de PCL en solución tampón fosfato salina a 37°C muestran cambios poco significativos después de 12 meses en el peso de las películas [28].

Así queda establecido a partir de observaciones realizadas, que la pérdida de masa de estas películas de PCL con el tiempo de degradación conlleva dos etapas sucesivas: primero la pérdida de masa inicial a una velocidad baja y estable, y segundo, una rápida pérdida de masa que conduce a la fragmentación, y posterior disolución completa [28].

Estudios de degradación *in vitro* de PCL en solución tampón fosfato salina a 37°C muestran pérdidas de peso y absorción de agua poco significativas después de 110 semanas; explicado este comportamiento por su hidrofobicidad [29].

Sun y colaboradores, realizaron un estudio de PCL encapsulado implantado en una rata durante tres años. Los resultados mostraron que la forma de las cápsulas de PCL con M_w de 66.000 g/mol no se vio alterada después de dos años de ser implantadas, mientras que se rompieron al cabo de 30 meses reduciéndose el M_w a 8.000 g/mol [30].

1.2.- BIOMATERIALES POLIMÉRICOS.

Los polímeros para su aplicación como biomateriales suelen clasificarse dependiendo de su origen en dos grandes grupos, naturales y sintéticos. Estos últimos están teniendo un gran desarrollo debido a la gran versatilidad y disponibilidad para el diseño con propiedades seleccionadas casi a medida, lo que minimiza en muchos casos la respuesta inmunológica asociada a los polímeros de origen natural.

Debido a esta gran versatilidad en su composición y propiedades se encuentran infinidad de aplicaciones clínicas en las que los biomateriales poliméricos juegan un papel principal. La Figura 1.3 muestra algunos de las aplicaciones médicas más utilizadas en la actualidad [31].

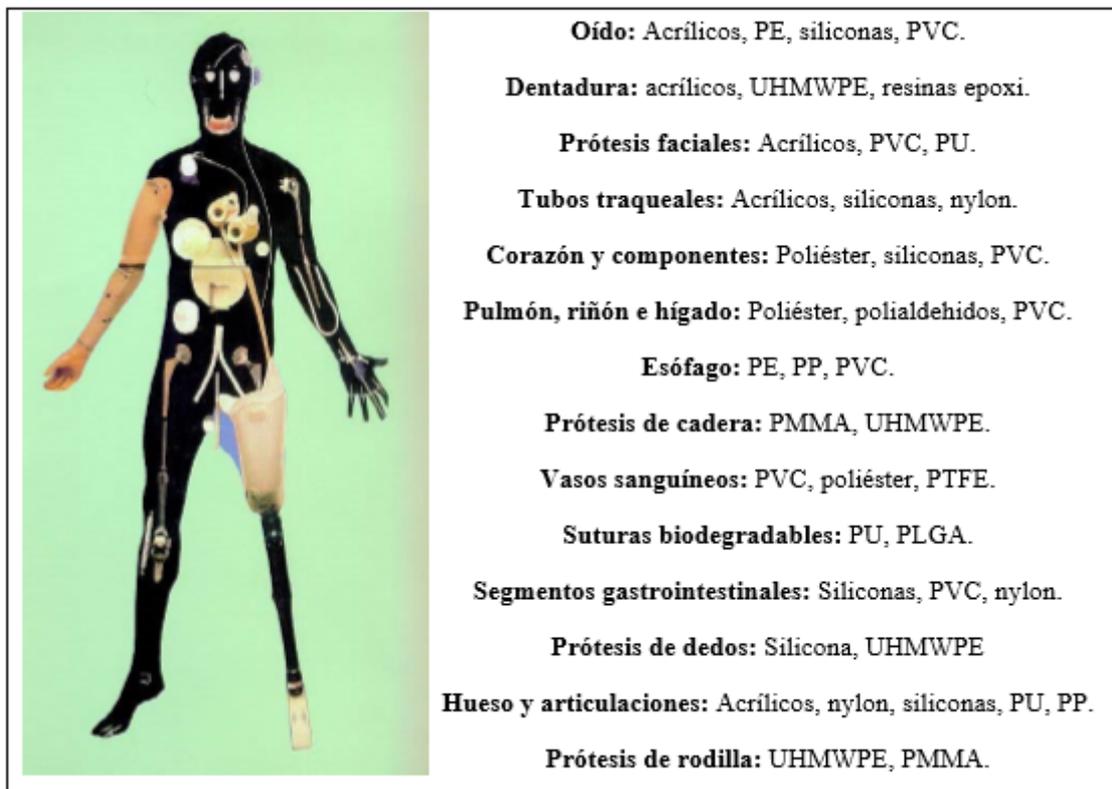


Figura 1.3. Aplicaciones médicas de polímeros usados como biomateriales

La selección de un polímero para su uso en aplicaciones quirúrgicas, dermatológicas, ortopédicas, oftalmológicas, farmacéuticas, etc., viene determinado principalmente por su estructura química y física. Por eso la

caracterización de estas propiedades es una parte muy importante en el desarrollo de estos nuevos materiales.

Actualmente los soportes porosos tridimensionales, están siendo ampliamente estudiados, debido a sus diversas aplicaciones potenciales en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa [32,33]. Estos materiales proporcionan condiciones óptimas para la proliferación y diferenciación celular, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los polímeros biodegradables utilizados como sistemas de liberación de fármacos están recogidos en la Figura 1.4.

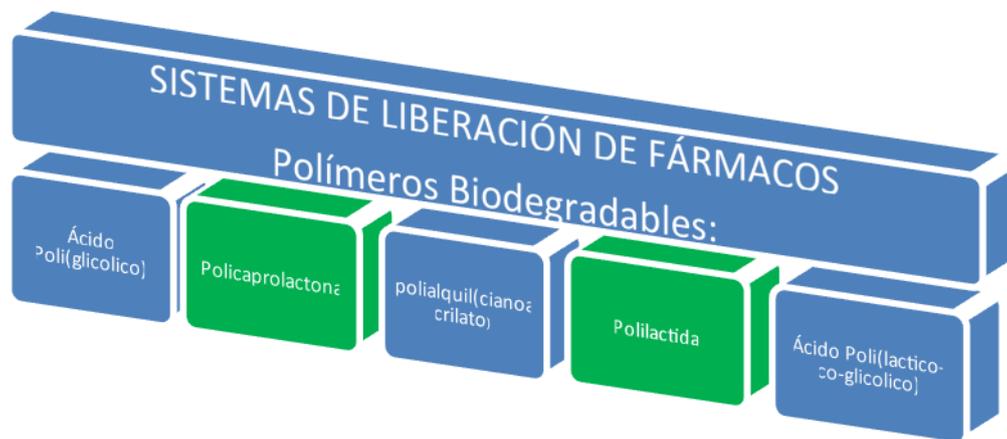


Figura 1.4.- Polímeros biodegradables usados en aplicaciones de sistemas de liberación de fármacos.

La posible incorporación en la matriz polimérica de partículas bioactivas, tales como: nano hidroxapatita (nHA) [34,35], fosfato tricálcico [36-38], bioglass [39-41] y partículas magnéticas [32]; mejoran las propiedades mecánicas, fisicoquímicas y bioactivos de los materiales fabricados.

En particular, las nanopartículas magnéticas se usan ampliamente en medicina, por ejemplo en la terapia de tratamiento contra el cáncer (especialmente en terapia de hipertermia), el diagnóstico de resonancia magnética y la administración de medicamentos [42-46].

En un tratamiento de quimioterapia donde es necesario un suministro de fármacos agresivos, con efectos secundarios en todo el organismo, podríamos

usar estos polímeros porosos. Si estos fármacos se pudieran cargar con nanopartículas magnéticas, sería posible localizarlos en una zona concreta y, de esta forma, lograr una mayor eficacia reduciéndose los efectos secundarios. Se podría calentar una zona concreta dentro del cuerpo mediante la aplicación de campos magnéticos, de forma selectiva y así facilitar la destrucción de tumores.

Habría que funcionalizar las nanopartículas magnéticas para facilitar su adherencia a las células tumorales. Y para facilitar su eliminación selectiva, aplicar un campo magnético alterno, que producirá calor sin superar los 47° C. Y a su vez, utilizando matrices apropiadas, nanopartículas magnéticas y fármacos, se pueden diseñar materiales inteligentes, que utilizando un campo magnético, liberen el fármaco en el momento preciso y en el lugar adecuado.

1.2.1.- POLIÉSTERES

Actualmente, los polímeros sintéticos biodegradables más extensamente estudiados y empleados son los poliésteres en general y el poli(ácido glicólico) (PGA), el poli(ácido láctico) (PLA) y sus copolímeros en particular. Estos poli(α -hidroxiácidos) abarcan la mayor parte del mercado actual en el ámbito biomédico.

Los poliésteres han sido tradicionalmente utilizados como materiales biodegradables sintéticos, principalmente como suturas quirúrgicas. Actualmente, los poliésteres son particularmente atractivos como sistemas poliméricos inyectables para la liberación controlada de fármacos por su biodegradabilidad, falta de toxicidad, biocompatibilidad y por ser fácilmente combinables con una amplia variedad de principios activos.

1.2.1.1.- Poli-L-Lactida (PLLA).

El poli(ácido láctico) o polilactida es un poliéster alifático termoplástico, biocompatible y reabsorbible; que se obtiene por polimerización por apertura de anillo del dímero cíclico del ácido láctico, la lactida. La poli-L-láctida (PLLA) es

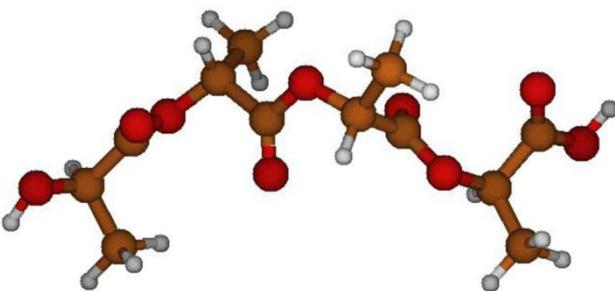
el producto resultante de la polimerización de ácido L, L-láctico (también conocido como L-láctico o L-lactida).

El PLLA contiene dos isómeros ópticos, el *D*(-) láctico y el *L*(+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas *D*(-) y *L*(+), estas dos formas pueden ser polimerizadas. La configuración *L*(+) es metabolizada por el cuerpo humano a diferencia del *D*(-). El material tiene alta tensión y baja elongación lo que se traduce en un elevado módulo de Young. Este polímero es adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como son las suturas y fijaciones ortopédicas [47].

El uso del PLLA para aplicaciones en humanos está aprobado por la FDA [48]. El PLLA tiene una gran sensibilidad térmica, por lo que se degrada con gran facilidad [49].

Sus características térmicas están definidas por un elevado punto de fusión (175-178° °C) y una temperatura de transición vítrea de 60-65 °C. Dichas temperaturas pueden variar debido a la presencia de otros elementos .En la Tabla 1.1 se presenta un resumen de las propiedades físicas y químicas del PLLA.

Tabla 1.1.-Resumen de propiedades físicas y químicas del PLLA

Acido Poli- Láctico, ácido poly (2 hidroxipropiónico)	
	
Temperatura de fusión (Tm)	175-178 °C
Temperatura de transición vítrea (Tg)	60-65°C
Soluble en	Dioxano, Dicloroetano, Heptano, DMF, Isopropanol, MIBK, Octanol,

	THF, Tolueno
Estado	Semicristalino

Debido a que la lactida es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, el uso de este hidroxácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico.

Los poliésteres alfa, como el PLA se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada in vivo por la presencia de enzimas [50], lo cual conlleva la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico o lactida en este caso). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica.

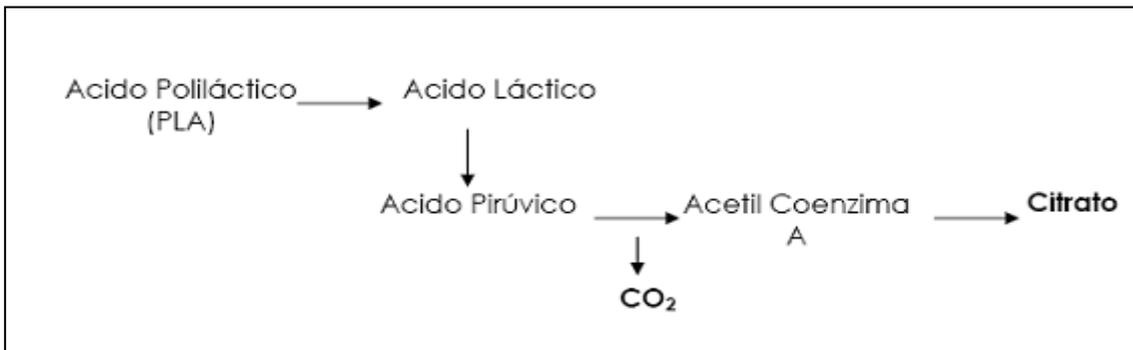


Figura 1.5.- Esquema de degradación del ácido poliláctico o polilactida en el organismo

La ruta metabólica de la láctida comienza con la transformación de lactato a piruvato por la acción de la enzima lactato dehidrogenasa, una vez convertido en piruvato, éste sufre una decarboxilación oxidativa para producir acetilcoenzima A. Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido tricarbóxico (o ciclo del ácido cítrico), el cual se lleva a cabo a nivel mitocondrial obteniéndose como resultado ATP por fosforilación oxidativa más agua y dióxido de carbono, los cuales son eliminados en la respiración y excretados por los riñones.

La poli-L-lactida es más resistente a la degradación hidrolítica que la forma racémica del mismo polímero, factor que puede ser atribuido al elevado grado de cristalinidad debido a su estereoregularidad. El material tiene elevada resistencia a la tensión, una reducida deformación y, consecuentemente, un módulo de Young elevado. Por este motivo es capaz de soportar una carga como son las suturas y las fijaciones ortopédicas.

Una de las desventajas de los poli(α -hidroxiácidos), en general, es que sus productos de degradación dan lugar a una reducción local del pH; acelerando el proceso de degradación del propio polímero por autocatálisis e induciendo una respuesta inflamatoria [51]. No obstante, este problema ha podido solventarse mediante la optimización de metodologías de proceso encaminadas a favorecer una rotura gradual. Otra desventaja de estos materiales radica en que los “andamios” altamente porosos son relativamente débiles, lo cual limita su uso en la regeneración de tejidos duros.

1.2.1.2- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

La poli(ϵ -caprolactona) se prepara comercialmente mediante una polimerización por apertura de anillo de la correspondiente lactona. El polímero es semicristalino, presenta un bajo punto de fusión (57 °C) y una baja temperatura de transición vítrea (-60 °C). Por esta razón, en condiciones normales siempre se encuentra en estado gomoso. Esta naturaleza física contribuye a conferir una elevada permeabilidad a un gran número de fármacos. El polímero es estable térmicamente y es compatible con otros polímeros [51]. Es un material con buenas propiedades mecánicas y buena solubilidad con otros polímeros. Puede polimerizarse por apertura de anillo a partir de ϵ -caprolactona o por policondensación a partir de ácido 6-hidroxihexanoico.

La policaprolactona es semicristalina con un grado de cristalinidad que puede llegar al 69% y su celda tiene una estructura cristalina ortorrómbica. Sus propiedades físicas, térmicas y mecánicas dependen de su peso molecular y de su grado de cristalinidad. A temperatura ambiente es altamente soluble en

cloroformo, benceno o tolueno; siendo miscible con muchos otros polímeros: PVC, SAN, ABS, PC, etc.

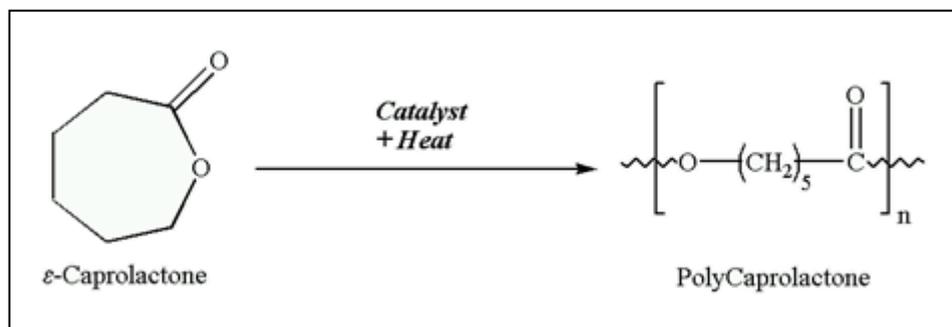


Figura 1.6. Síntesis de la poli(ε-caprolactona).

La PCL es un material biocompatible que se degrada fácilmente por hidrólisis de sus enlaces éster. En el proceso de degradación primero ocurre una rotura de las cadenas moleculares, de forma que disminuye el peso molecular, y posteriormente estas cadenas, más pequeñas, son transportadas fuera del lugar de implantación por los fluidos del cuerpo o por fagocitosis. El tiempo de degradación de la PCL oscila entre meses y años dependiendo del peso molecular, el grado de cristalinidad o las condiciones de degradación. La degradación natural se da primero en la parte amorfa y su mecanismo varía según la temperatura, siendo una reacción auto-catalizada por la liberación de ácidos carboxílicos resultantes de la hidrólisis.

La reducida velocidad de degradación de la PCL le confiere una idoneidad como sistema liberador de fármacos.

En la actualidad, este material se considera no tóxico y compatible con los tejidos según la FDA, de ahí sus aplicaciones en ingeniería de tejidos [52,53]. No obstante este material presenta grandes tiempos de degradación lo cual a veces es una desventaja en aplicaciones biomédicas. La degradación *in vivo* del poli D-láctico es 2,8 veces más rápida que la degradación de cadenas de poli(ε-caprolactona) en las mismas condiciones [53].

1.3.- FUNDAMENTOS DE MAGNETISMO. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y APLICACIONES BIOMÉDICAS.

1.3.1.- Fundamentos de magnetismo

El campo magnético \mathbf{B} se define por la fuerza magnética \mathbf{F}_m sobre partículas cargadas en movimiento: $\vec{F}_m = q\vec{v} \times \vec{B}$, donde q es la carga y v la velocidad de la partícula.

\mathbf{B} se mide en Tesla = N/Am, aunque se sigue usando la unidad antigua de Gauss [G] cuya equivalencia es: $1 [T] = 10^4 [G]$. \mathbf{B} recibe contribuciones de las corrientes macroscópicas y de la materia imanada, que a su vez proviene de las corrientes atómicas. En general, pues, se escribe:

$$B = \mu_o(H + M) \quad (1)$$

Donde μ_o es la permeabilidad magnética del vacío, \mathbf{H} es el campo imanador o excitación magnética y \mathbf{M} la imanación. Tanto el campo imanador como la imanación se miden en Amperios por metro (A/m), aunque para H se suele utilizar la unidad antigua de Oersted [Oe] cuya equivalencia es: $1[Oe] = 79.59 [A/m]$.

\mathbf{H} se debe en general a corrientes macroscópicas. Así, para un hilo que conduce una corriente (I) el campo es circular en el sentido de giro de un sacacorchos que avance según la corriente, y a una distancia R del hilo vale:

$$H = \frac{I}{2\pi R} \quad (2)$$

En los materiales magnéticos, la imanación \mathbf{M} se define como la densidad de momento magnético, o momento magnético por unidad de volumen, y proviene tanto de los momentos angulares orbitales como del espín de los electrones. El momento magnético asociado al movimiento orbital suele estar bloqueado por lo que muchas veces solamente contribuye el espín. Esto hace que se suele identificar el momento magnético de un átomo con su espín, utilizando indistintamente ambos términos.

Las unidades del momento magnético son [Am^2], pero a nivel atómico una unidad más adecuada es el magnetón de Bohr: $1\mu_B = 9,27 \times 10^{-24} Am^2$

La imanación, en general, es la respuesta de la materia al campo (**H**), y la relación entre **M** y **H** es una propiedad intrínseca de los materiales, llamada susceptibilidad magnética (adimensional):

$$\chi = \frac{M}{H} \quad (3)$$

con lo que la relación entre B y H se escribe:

$$B = \mu_0(H + M) = \mu_0(H + \chi H) = \mu_0(1 + \chi)H = \mu H = \mu_0 \mu_r H \quad (4)$$

Siendo μ la permeabilidad magnética del material, y $\mu_r = (1 + \chi)$ la permeabilidad relativa, que es adimensional.

En el vacío, $M=0$ y la relación entre B y H es:

$$B = \mu_0 H \quad (5)$$

Lo que justifica el nombre de μ_0 como permeabilidad del vacío.

Tipos de comportamiento magnético

Toda la materia responde a la presencia de un campo magnético externo, aunque el tipo de respuesta varía de unos materiales a otros. De acuerdo con el valor de su susceptibilidad, el comportamiento magnético de un material se clasifica en cinco formas básicas de magnetismo: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo y ferrimagnetismo [54,55].

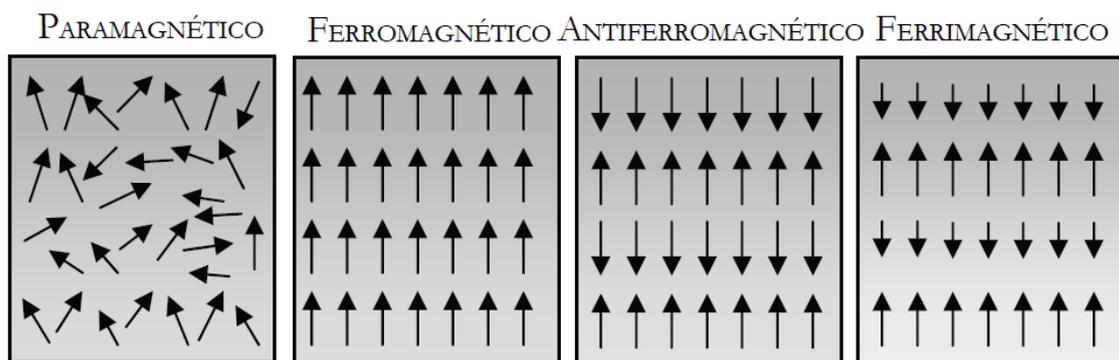


Figura 1.7.- Distintas respuesta magnética de los sólidos al aplicar un campo magnético externo

DIAMAGNETISMO: En presencia de un campo magnético externo, las corrientes atómicas sufren el fenómeno de la Inducción de Faraday y se produce un momento inducido que se opone al campo aplicado. Todos los

materiales muestran esta respuesta a un campo magnético, y se conoce como diamagnetismo. El diamagnetismo es muy débil y, por consiguiente, cualquier otra contribución al comportamiento magnético del material lo supera, generalmente. Los materiales puramente diamagnéticos se caracterizan por no presentar electrones desapareados por lo que su momento magnético atómico es nulo y no hay otras contribuciones al magnetismo. Su susceptibilidad magnética χ es negativa (Figura 1.8, color rojo), débil e independiente de la temperatura, y la permeabilidad magnética relativa μ_r es ligeramente menor de la unidad.

PARAMAGNETISMO: En los materiales cuyos electrones atómicos no están apareados, el momento magnético atómico es diferente de cero y muestran paramagnetismo: adquieren una imanación paralela al campo aplicado (Figura 1.8, color verde). La susceptibilidad es ligeramente positiva ($\chi \sim 0$) y depende de la temperatura, y la permeabilidad relativa será ligeramente mayor que la unidad.

Tanto el paramagnetismo como el diamagnetismo son efectos débiles y a veces se desprecian como "no magnéticos".

FERROMAGNETISMO: Es el tipo más fuerte e importante de magnetismo. En estos materiales la interacción cuántica entre los espines vecinos (interacción de canje o intercambio) es tan fuerte, que los momentos magnéticos de todos los átomos están alineados paralelamente y se oponen al efecto de la temperatura, que tiende a desordenarlos, dando lugar a una imanación espontánea (en ausencia de campo externo) por debajo de la temperatura de Curie. Por encima de la temperatura de Curie, la energía térmica es suficiente para vencer el canje, comportando la desaparición de su ordenación de largo alcance, y los materiales exhiben comportamiento paramagnético.

Los fuertes acoplamientos de los espines que dan lugar a la imanación espontánea se producen en zonas limitadas, llamadas dominios magnéticos. La imanación dentro de cada dominio puede estar dirigida al azar, de manera que el material aparece macroscópicamente desimanado. La máxima imanación posible (imanación de saturación) corresponde a la situación en que todos los momentos magnéticos en una muestra sólida están alineados con el

campo externo y supone la orientación de todos sus dominios en la misma dirección. Estos materiales presentan una permeabilidad magnética relativa en torno a 10^5 y una susceptibilidad magnética positiva y muy grande, ambas dependientes de H y de la temperatura.

A veces la imanación persiste después de eliminar el campo magnético externo, dando lugar a una imanación remanente (Figura 1.8, color negro). Los materiales que conservan una imanación en ausencia de un campo magnético aplicado se conocen como imanes permanentes. El campo necesario para anular la imanación se llama campo coercitivo (H_c).

ANTIFERROMAGNETISMO: En los materiales ferromagnéticos la interacción de canje favorece que los momentos magnéticos de todos los átomos están alineados paralelamente. Por el contrario, en los materiales antiferromagnéticos (por ejemplo, la troilita, FeS), la interacción de canje es negativa, los momentos magnéticos atómicos se ordenan de manera antiparalela y, si son de igual magnitud, muestran una imanación neta nula por debajo de la temperatura de Néel (análoga a la temperatura de Curie pero aplicada a este tipo de materiales). La estructura magnética puede describirse como dos redes de momentos acoplados ferromagnéticamente dentro de cada una y opuestas entre sí.

Por encima de la temperatura de Néel, la energía térmica es suficiente para la desaparición de su ordenación de largo alcance, y los materiales exhiben un comportamiento paramagnético clásico. Por debajo de la temperatura de Néel, al no existir imanación espontánea, el comportamiento macroscópico de los antiferromagnéticos es también equivalente al de un paramagnético, pero su dependencia con la temperatura es anómala

FERRIMAGNETISMO: Si los espines están alineados de forma antiparalela, pero el momento magnético resultante no se anula, por no haber el mismo número de átomos en cada dirección o tener tomos con distintos momentos magnéticos, el material presenta imanación espontánea por debajo de la temperatura de Curie, y se dice que es ferrimagnético [56]. El nombre proviene de las ferritas (Fe_2MO_4 , M=metal de transición) que presentan este comportamiento. La ferrita de hierro (Fe_3O_4) se llama magnetita y es el primer

material magnético conocido. Por encima de la temperatura de Curie, la substancia se transforma en paramagnética.

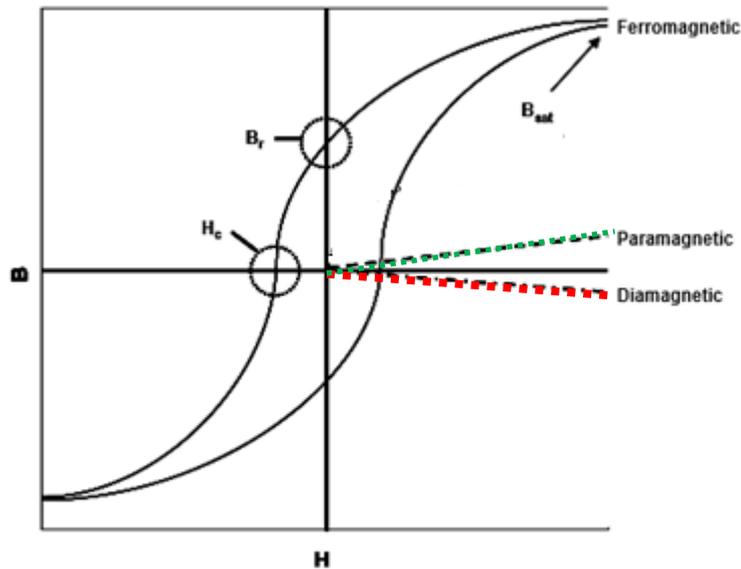


Figura 1.8.-Curvas de imanación para materiales dia-, para- y ferromagnéticos.

Tanto en los materiales ferromagnéticos como antiferromagnéticos y ferrimagnéticos existen unas direcciones cristalográficas preferentes para la imanación, es decir presentan anisotropía magnética. La energía de anisotropía es aquella que se necesita para apartar la imanación de las direcciones preferentes y es muy importante para determinar las curvas de imanación de estos materiales.

EFFECTOS DE TAMAÑO, NANOMAGNETISMO

Para los materiales masivos, las propiedades magnéticas dependen de su composición, su estructura cristalográfica, su energía de anisotropía magnética, sus vacantes y defectos, pero no de su tamaño. Sin embargo, cuando el tamaño decrece hasta dimensiones nanométricas, la relación superficie/volumen se convierte en un parámetro clave que controla las propiedades magnéticas de las partículas. Así una característica importante de los materiales ferromagnéticos es su estructura de dominios. Por debajo de un tamaño crítico (D_{CRIT}) la partícula solamente puede consistir en un dominio. Se dice que es una partícula monodominio.

La imanación de saturación (M_S) es otra de las propiedades que se ven afectadas cuando el tamaño decrece hasta valores nanométricos (Figura 1.9). Para materiales masivos el valor de M_S es constante y el máximo que se puede alcanzar para ese material. Cuando se desciende por debajo del D_{CRIT} , los efectos de superficie influyen notablemente en el valor de la imanación de un material. Esto se debe a la disminución de la interacción de canje en los átomos superficiales (que ahora son una parte importante del total): Los átomos superficiales presentan una falta de simetría y coordinación respecto a los átomos que se encuentran en el interior [57,58], dando lugar a una disminución de la imanación [59].

Otra de las propiedades magnéticas que cambia drásticamente con el tamaño de la partícula es la coercitividad (H_C). Un material masivo está estructurado en múltiples dominios separados por paredes de dominio. En este caso, el mecanismo de imanación se realiza por movimiento de las paredes de dominio. En este caso H_C varían poco con el tamaño de partícula como se puede concluir de la siguiente expresión (Figura 1.9, I):

$$H_C = a + \frac{b}{D} \quad (6)$$

donde a y b son constantes y D es el tamaño de partícula, supuesto grande frente a D_{CRIT} . Al acercarse D al D_{CRIT} la coercitividad aumenta considerablemente debido a que las paredes de dominio están bloqueadas por defectos y por la superficie e interviene otro mecanismo de imanación (Figura 1.9) el de la rotación coherente de los espines dentro de un dominio (Figura 1.9, II). La coercitividad alcanza un máximo para $D = D_{CRIT}$. Cuando el tamaño de partícula se encuentra por debajo de D_{CRIT} y las partículas son monodominio, la inversión de la imanación se produce solamente por la rotación coherente de los espines. H_C disminuye al disminuir el tamaño debido al efecto de la energía térmica, que ayuda a la inversión de la imanación en contra de la energía de anisotropía. (Figura 1.9, III):

Eventualmente H_C se anula para un tamaño suficientemente pequeño (D_{S-F}) ya que por efecto de la temperatura la desimanación ocurre espontáneamente, dando lugar al fenómeno del superparamagnetismo que se explica más adelante [60] Figura 1.9,III).

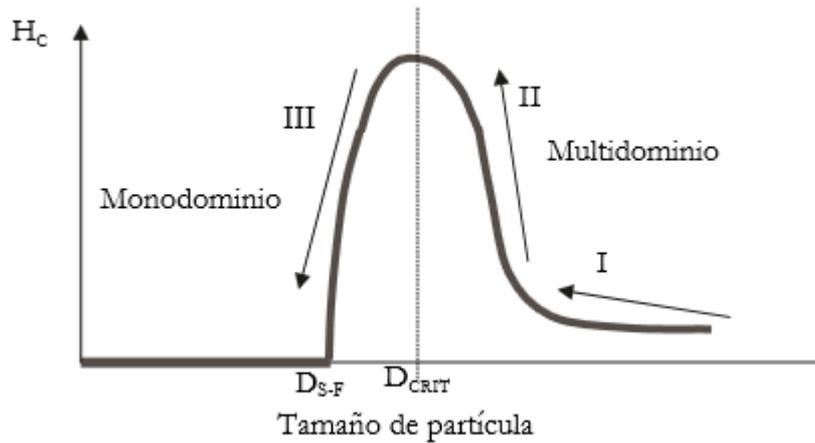


Figura 1.9.- Variación de la coercitividad H_c en función del tamaño de partícula

Otra propiedad que depende del tamaño de las partículas es la energía de interacción que existe entre ellas que es muy importante en la preparación de dispersiones en líquidos (ferrofluidos). Partículas con tamaños menores que el D_{CRIT} , pero mayores que D_{S-F} poseen un momento magnético no nulo en ausencia de campo aplicado, por lo que se origina una interacción atractiva entre ellas ya que cada partícula funciona como un imán y tienden a aglomerarse. Cuando el tamaño de partícula disminuye hasta el régimen superparamagnético, D menor que D_{S-F} , cada partícula funciona como un momento magnético fluctuante y la interacción promedia a cero.

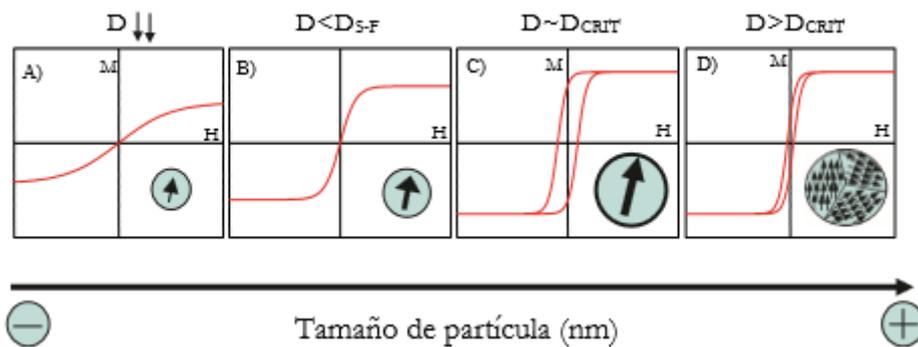


Figura 1.10.- Variación de la forma de la curva de imanación en función del tamaño de partícula

SUPERPARAMAGNETISMO

Cuando el tamaño de una partícula magnética es inferior al tamaño crítico (D_{CRIT}) es un monodominio. Esto da lugar a que cada partícula se comporte

como un pequeño imán, con un momento magnético muchos miles de veces mayor que los paramagnéticos [61,62] (Figura 1.10). Por debajo de un tamaño (D_{S-F}) el momento magnético de cada dominio es inestable y se orienta al azar, debido a las fluctuaciones térmicas que superan a la energía de anisotropía, y por tanto el momento magnético resultante es nulo, al igual que los sólidos paramagnéticos. Este comportamiento es el que hemos denominado superparamagnetismo (Figura 1.11).

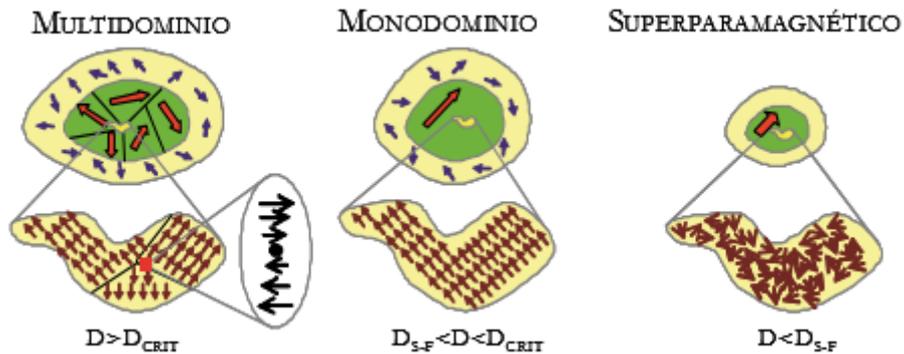


Figura 1.11.- Estructura magnética de los sólidos ferromagnéticos en función del tamaño de partícula: multidominio, monodominio y superparamagnético.

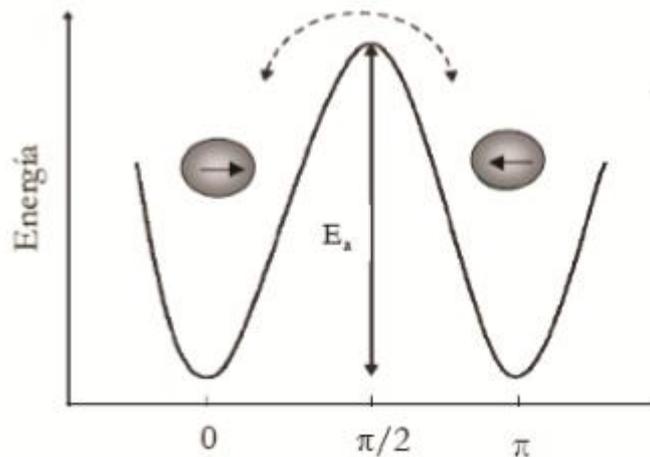


Figura 1.12.- Variación de la energía de una partícula monodominio con anisotropía uniaxial en función del ángulo de de la imanación.

La energía de anisotropía (E_a) es la barrera de energía necesaria que hay que superar para invertir el momento magnético (Figura 1.12). Esta energía es proporcional al volumen de la partícula. Cuando el volumen de las partículas es pequeño, para una temperatura dada, E_a es del mismo orden o inferior a la energía térmica: $K_B T$ (K_B es la cte de Boltzmann y T la temperatura absoluta) y

el momento magnético de las partículas puede fluctuar de dirección espontáneamente. Para cada temperatura existe un tamaño crítico distinto a partir del cual la energía térmica no es suficiente para invertir el momento, éste se queda bloqueado y la partícula se comporta como ferro o ferrimagnética. A su vez, manteniendo el volumen de las partículas constante, al bajar la temperatura se llega a la temperatura de bloqueo (T_B) por debajo de la cual ya no hay energía suficiente para invertir los momentos magnéticos y por lo tanto también se comportan como ferro o ferrimagnéticos.

El efecto de un campo magnético en un superparamagnético es mucho mayor que en un paramagnético normal, pues el momento de cada partícula es miles de veces mayor que el de un átomo aislado. Esto hace que se imanen con facilidad, pero sin histéresis.

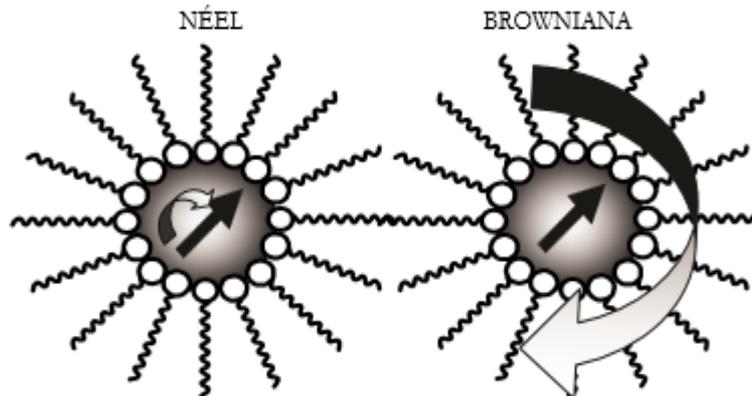


Figura 1.13.- Mecanismos de relajación del momento magnético

RELAJACIÓN MAGNÉTICA

Al eliminar el campo magnético aplicado a un conjunto de partículas superparamagnéticas, las fluctuaciones térmicas reorientan al azar los momentos magnéticos. Este efecto se denomina relajación magnética y ocurre mediante la acción de dos mecanismos principales, el mecanismo de relajación de Brown [56] y el de Néel [63] (Figura 1.13). La relajación de Néel implica las fluctuaciones térmicas de la imanación dentro de la partícula, mientras la relajación Browniana implica el giro completo de la partícula en el medio en que esté embebida. Esta última solamente puede tener lugar en partículas

dispersadas en un líquido, pues en un sólido las partículas no tienen libertad de girar.

1.3.2.- NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y APLICACIONES BIOMÉDICAS

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) tienen una gran variedad de aplicaciones en el campo de la biomedicina, fundamentalmente en las áreas del diagnóstico y la terapia. Las NPMs están compuestas, en general, por un núcleo magnético y una envoltura polimérica biocompatible y funcionalizable. Las NPMs más utilizadas en biomedicina oscilan entre 5 y 100 nm de diámetro, lo que supone unas dimensiones menores o comparables a los de una célula (10-100 micras), un virus (20-450 nm), una proteína (5-50 nm) o un gen (2 nm de ancho y largo 10-100 nm). Esto las hace afines en cuanto a dimensiones se refiere a las entidades biológicas de interés.

El interés de las NPMs deriva fundamentalmente de las propiedades físicas de su núcleo magnético, de su alta relación superficie/tamaño y de la capacidad que poseen para unir moléculas de interés biológico a su superficie. Además, su pequeño tamaño posibilita su interacción con estructuras celulares, ofreciendo una herramienta de trabajo útil para manipular diferentes funciones e interaccionar con estructuras subcelulares y moleculares. Las NPMs ofrecen nuevas posibilidades entre las se pueden destacar la mejora de la calidad de imagen de resonancia magnética, el tratamiento de células cancerígenas mediante terapia hipertérmica en respuesta a un campo externo, la liberación controlada de fármacos dirigida al área afectada, la manipulación de membranas celulares y la separación magnética de células u otras entidades biológicas (Figura 1.14.). Por tanto, las NPMs poseen un amplio espectro de aplicaciones tanto en el campo del diagnóstico como en el tratamiento de patologías tan diferentes como cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas [64,65].

Las NPMs más utilizadas e investigadas hasta el momento son las partículas con núcleo magnético formado por óxido de hierro, típicamente magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanocristalinas, debido fundamentalmente a sus propiedades magnéticas y a su sencillo proceso de síntesis. Además de

por sus propiedades magnéticas, la utilidad de las NPs de óxido de hierro viene dada por su alta biocompatibilidad y fácil biodegradación en el organismo. Después de ser metabolizadas, los iones de hierro de estas partículas son añadidos a los depósitos de hierro del organismo y eventualmente son incorporados por los eritrocitos como parte de la hemoglobina [66].

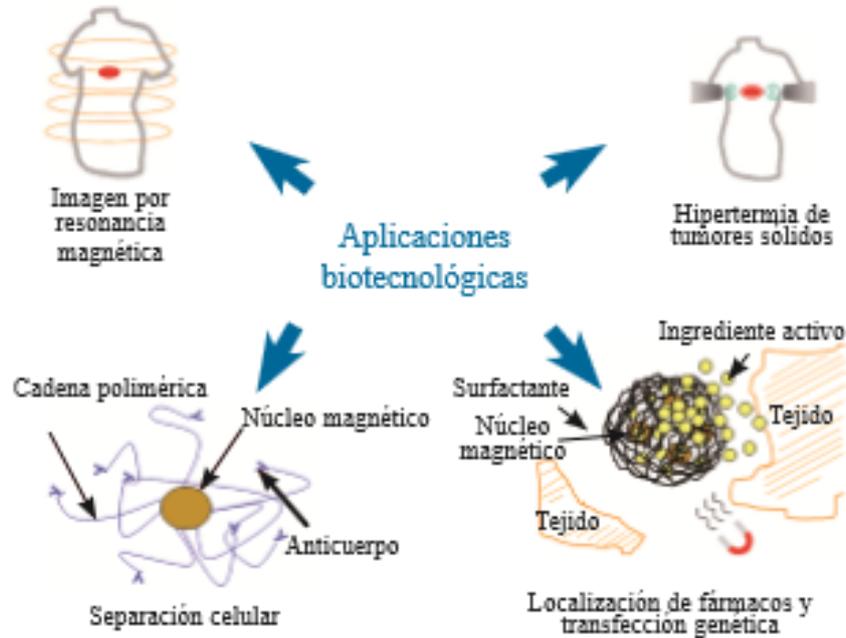


Figura 1.14.- Expectativas de aplicaciones biotecnológicas de las nanopartículas magnéticas. Ref.[67]

En ausencia de recubrimientos, las NPMs, aunque tengan propiedades superparamagnéticas, muestran superficies hidrofóbicas que facilitan la aglomeración, especialmente en fluidos biológicos, debido a la presencia de sales y proteínas plasmáticas, dando lugar a agregados de gran tamaño [68]. Estos agregados de NPMs son incompatibles con su utilización en aplicaciones biomédicas, debido a la alta posibilidad de que se produzca una obstrucción de pequeños capilares. La cubierta polimérica proporciona una barrera física que previene la aglomeración de las partículas.

Utilizando unos recubrimientos de superficie adecuados, las NPMs pueden dispersarse fácilmente en soluciones fisiológicas formando suspensiones homogéneas llamadas ferrofluidos. Estas suspensiones pueden interactuar con un campo magnético externo y ser posicionadas en un área específica,

facilitando la imagen de resonancia magnética para diagnóstico médico de diferentes patologías.

Las NPMs recubiertas de polímeros biodegradables muestran una menor toxicidad y tienen una mayor biocompatibilidad que las NPMs inorgánicas sin recubrir con polímeros. Los polímeros más utilizados como recubrimientos de NPMs son el polisacárido dextrano, utilizado por su alta biocompatibilidad y alta afinidad por el hierro [69] y el polietilenglicol (PEG), con gran capacidad antiadherente que reduce la captación de las partículas por los macrófagos, aumentando su tiempo de circulación en sangre [70].

Otros polímeros utilizados de forma habitual como recubrimientos para NPMs son el polivinilalcohol (PVA) [71] con buenas propiedades emulsionantes y el quitosano que proporciona una envoltura biocompatible, catiónica e hidrofílica [72].

TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE FÁRMACO

Una de las mayores desventajas que tienen muchos de los tratamientos terapéuticos es que los fármacos no son dirigidos específicamente al órgano o tejido dañado por la enfermedad. Los fármacos suelen ser administrados por vía intravenosa dando lugar a una distribución por todo el torrente sanguíneo y causando efectos secundarios cuando el fármaco actúa en células sanas en vez de en las dañadas. Para remediar estos efectos secundarios se ha propuesto recientemente el uso de nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ que pueden ser dirigidas específicamente al órgano o tejido deseado con la ayuda de un campo magnético [73]. A su vez, estas partículas pueden ser convenientemente recubiertas por determinadas moléculas o polímeros con el fin de unir los fármacos a su superficie y liberarlos en la zona de interés [74].

Para estas aplicaciones, el tamaño, carga y química de la superficie de las partículas magnéticas son particularmente importantes y se ven fuertemente afectados tanto el tiempo de circulación en sangre y la biocompatibilidad [75]. Las partículas más grandes, 200 nm, suelen ser secuestradas por el bazo debido a su filtración mecánica y son eliminadas finalmente a través del

sistema de fagocitos, que conduce a la disminución de estas en el torrente sanguíneo. Considerando que, partículas más pequeñas de 10 nm o menos se eliminan rápidamente a través de la depuración renal. Los diámetros de partículas de 10 a 100 nm son ideales para inyección intravenosa y exhibieron los tiempos de circulación en sangre más prolongados [76].

En el caso de la vectorización de fármacos, la manipulación de las partículas se lleva a cabo mediante la aplicación de un campo magnético no uniforme, ya que de no serlo no se conseguiría mover las partículas sino la alineación de los momentos magnéticos [77-79]. Dentro del cuerpo humano, las partículas están sometidas a las fuerzas de resistencia hidrodinámicas que se oponen a la fuerza del campo magnético aplicado. Por lo tanto, desde el punto de vista físico, a la hora de manipular las partículas en el menor tiempo posible siempre será preferible partículas de mayor tamaño (D_{MAG}) o mayor imanación (B) [64].

HIPERTERMIA

La hipertermia ha sido ampliamente investigada para su uso en terapia de tumores [80], ya sea como única modalidad de tratamiento o conjuntamente con radio o quimioterapia [81]. Muchos estudios han mostrado que las células tumorales son más susceptibles a la destrucción por calor, debido en parte a la relativamente mayor hipoxia y menor pH en tumores sólidos [81]. Los efectos secundarios por hipertermia en tejidos normales son insignificantes a temperaturas menores de 41.8°C, y puede emplearse repetidamente sin acumular daño en el tejido normal [64].

A pesar de las ventajas potenciales, se ha encontrado que el tratamiento hipertérmico en tumores sólidos tiene una selectividad limitada de destrucción de tumores [64]. Esta selectividad se debe en parte a la incapacidad de los métodos de tratamiento hipertérmico empleados con anterioridad para producir una temperatura diferencial suficiente entre el tumor y el tejido normal que le rodea [64].

La posibilidad de tratar cáncer por hipertermia artificialmente inducida, ha llevado a la aplicación de materiales magnéticos, los cuales calientan el tejido al exponerlos a un campo magnético [64]. En términos generales, el

procedimiento involucra la dispersión de partículas magnéticas a través de un tejido objetivo, y después la aplicación de un campo magnético alterno (AC) de una frecuencia y amplitud apropiadas para inducir el calentamiento de las partículas [64]. Mientras que la mayoría de los dispositivos de hipertermia son de utilidad restringida, debido al inaceptable calentamiento del tejido sano, la hipertermia con partículas magnéticas resulta atractiva ya que permite el calentamiento sólo del tejido objetivo [64].

Es importante entender los mecanismos físicos a través de los cuales se genera calor en pequeñas partículas magnéticas mediante campos magnéticos alternos. En concreto estos mecanismos son la histéresis y la relajación magnética. En ambos se produce absorción de energía del campo por parte de las partículas y su transmisión al medio circundante. El cálculo de la velocidad de generación de calor requerida para alcanzar los efectos deseados es complicado, debido a la presencia del flujo sanguíneo y perfusión del tejido, ambas causan el enfriamiento de tejido, y estas pueden variar activamente mientras el tejido está siendo calentado [64].

La frecuencia y la fuerza del campo magnético AC externo aplicado usado para generar el calor están limitadas por las respuestas fatales fisiológicas a campos magnéticos de altas frecuencias como posible estimulación cardíaca y arritmia. En general, el rango aplicable de frecuencias y amplitudes está entre $f = 0.05 - 1.2$ MHz y $H = 0 - 15$ KAm⁻¹. Por otro lado, de datos experimentales se concluye que la exposición a campos donde el producto $H \cdot f$ no exceda de unos 5×10^8 A m⁻¹ s⁻¹ es seguro y tolerable [64].

La cantidad de material magnético requerido para producir las temperaturas necesarias depende casi en su totalidad del método de administración. Una razonable suposición es que 5–10 mg de material magnético concentrado en cada cm³ de tejido tumoral es apropiado para hipertermia magnética en pacientes humanos [64].

Considerando la elección de partícula magnética, los óxidos de hierro de magnetita (Fe₃O₄) y maghemita (γ -Fe₂O₃) son los más estudiados hasta la fecha debido a sus propiedades magnéticas apropiadas y compatibilidad biológica, aunque muchos otros han sido investigados. Los tamaños de partícula menores de 10 μ m son normalmente considerados suficientemente

pequeños para permitir el transporte efectivo al lugar con el cáncer, ya sea por encapsulación en una parte grande o suspensión en una forma de fluido portador. Los materiales candidatos están divididos en dos clases principales; partículas monodominio o multidominio ferromagnéticos o ferrimagnéticos (FM), o partículas superparamagnéticas (SPM). En el primer caso el mecanismo de calentamiento principal es la histesis y en el segundo la relajación. Cada uno tiene sus ventajas y sus inconvenientes [64].

Las medidas de generación de calor de partículas magnéticas son generalmente citadas en términos de velocidad de absorción específica o Specific Absorption Ratio (SAR) que se mide en unidades de $W \cdot g^{-1}$. Multiplicando SAR por la densidad de la partícula se obtiene P_{FM} y P_{SPM} (cantidad de calor generado dependiendo del tipo de nanopartículas), así este parámetro permite la comparación de las eficiencias de las partículas magnéticas en cualquier rango de tamaños [64].

1.4.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DE LA TESIS

La tendencia a agregarse de las NPs, especialmente en fluidos biológicos, hace que sea incompatible su utilización en muchas aplicaciones biomédicas, debido a la alta posibilidad de que se produzca una obstrucción de pequeños capilares. Por este motivo puede ser interesante fabricar soportes porosos tridimensionales utilizando polímeros y nanopartículas magnéticas de manera que se superen estos inconvenientes de la NPMs.

Como polímeros se proponen PCL o PLLA, cuya biocompatibilidad y bioabsorbilidad está ampliamente estudiada [11,12, 15-19]. Para la elección de las NPMs, parece adecuada la magnetita, debido a sus propiedades magnéticas apropiadas y compatibilidad biológica. Así como numerosos estudios de sus aplicaciones médicas en hipertermia [64,80] sola o conjuntamente con radio o quimioterapia para terapia de tumores [80]. También se ha usado en liberación controlada de fármacos [73, 74, 76-78], aunque sus efectos a largo plazo en el cuerpo humano todavía no están claros. También parece adecuado utilizar nano-hidroxiapatita dopada con Fe (nHAFé), para reforzar el soporte 3D de PCL o PLLA, siendo biocompatible y biodegradable.

Objetivos

El objetivo de nuestra investigación es la obtención y caracterización de soportes porosos con polímeros bioabsorbibles y biocompatibles (PCL o PLLA), modificados con nanopartículas magnética (magnetita o hidroxiapatita dopada con hierro) mediante la técnica de separación de fases inducida térmicamente o TIPS (*Thermally Induced Phase Separation*).

Por otro lado, con el objetivo de simular el comportamiento *in vivo*, se pretende realizar un estudio de degradación *in vitro* analizando los cambios acontecidos en cada uno de las muestras. Dentro de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos.

- Comparar el efecto de la adición de las nanopartículas magnéticas en los soportes de PCL y PLLA a lo largo de nuestro estudio de degradación.
- Comparar el grado de degradación de los composites preparados con los homopolímeros (PCL o PLLA) y con las nanopartículas magnéticas (nHAFé o nFe₃O₄) a través de las técnicas de caracterización SEM, FTIR, DSC, GPC
- Estudiar la evolución de la cristalinidad a lo largo del tiempo de degradación.
- Estudiar la citotoxicidad de los andamios de PLLA y PCL en función de las partículas magnéticas añadidas de nHAFé y nFe₃O₄.

Capítulo 2

Materiales y métodos

En este apartado se describen solamente los procesos de síntesis y caracterización utilizados en esta tesis. Una breve descripción de los métodos experimentales de síntesis y caracterización se encuentra en el Apéndice 1

2.1.- SÍNTESIS DE NANOHIIDROXIAPATITA DOPADA CON HIERRO (nHAFe).

El precipitado de nanohidroxiapatita dopada con hierro se obtiene, añadiendo gota a gota una disolución de ácido fosfórico a una suspensión básica de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, conteniendo iones Fe; durante dos horas con constante agitación y calentamiento. Las concentraciones totales de iones Fe frente a la de iones Ca se ajusta para obtener $\text{Fe}/\text{Ca}=20$ mol% Tampieri et al.[81] realizaron el estudio de los parámetros de síntesis y propiedades fisicoquímicas, el rango de temperaturas de estudio fue entre 25 y 60°C y con un pH decreciente de 12 a 5 durante la neutralización. Los productos de reacción se mantienen con agitación y calentamiento durante una hora. Posteriormente el precipitado se deja 24 horas envejecer a temperatura ambiente sin agitación. El precipitado se separa del licor madre mediante centrifugación, se lava con agua destilada y centrifugado tres veces. A continuación se liofiliza. Este procedimiento de síntesis puede utilizar tres métodos para la generación de fuente de iones Fe para el dopado de la nanohidroxiapatita: Método REDUCTOR, Método OXIDATIVO o Método de ADICIÓN SIMULTÁNEA.

Este último es el que hemos utilizado para la síntesis de nuestras nanopartículas nHAFe a 60°C. Se añaden conjuntamente $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como fuente de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} durante el proceso de neutralización, a diferentes temperaturas de síntesis (25, 40 y 60°C).

El protocolo experimental para la fabricación de estas nanopartículas, fue el siguiente:

1º.-Se prepararon las siguientes disoluciones:

- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, pureza del 98%) 12.74 g en 75 ml de H_2O destilada.
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich, pureza 97%), 17.86 g en 75 ml de H_2O destilada.
- H_3PO_4 (Sigma Aldrich, pureza 85%), 44.4 g en 300 ml de H_2O destilada.
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Sigma Aldrich, pureza 95%), 50 g en 400 ml de H_2O destilada con agitación magnética a 40°C.

2º.- Añadimos a la disolución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$; previamente preparada en un balón de reacción de tres bocas, simultáneamente las disoluciones fuentes de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} .

3º.- Dejamos en reposo esta disolución 24 horas.

4º.- Añadimos gota a gota durante 2 horas la disolución de H_3PO_4 ; mientras la mantenemos con agitación magnética a 60°C.

5º.- Tras la neutralización, dejamos el producto de reacción con agitación magnética y calentamiento a 60°C durante una hora.

6º.- Dejando envejecer 24 horas el producto de reacción a temperatura ambiente sin agitación.

7º.- El precipitado formado se centrifuga y lava 3 veces con agua destilada

8º.- Posteriormente se liofiliza el precipitado para eliminar la humedad.

9º.- Desmenuzamos en el mortero de ágata el precipitado.

10º.-Por último, lo hacemos pasar por un tamiz.

Se efectuó una segunda síntesis, el procedimiento experimental fue el mismo; exceptuando el tercer paso; es decir no se dejó la disolución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con las disoluciones fuentes de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} 24 horas en reposo.

2. 2.- CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Difracción de rayos X

La técnica de difracción de rayos X se ha empleado para estudiar las fases presentes en las nanopartículas sintetizadas, así como su cristalinidad.

El análisis de difracción de rayos X (DRX) se ha llevado a cabo con un difractómetro PANalytical Xpert PRO, equipado con tubo de cobre ($\lambda_{Cu_{K\alpha_{media}}}=1,5418 \text{ \AA}$, $\lambda_{Cu_{K\alpha_1}}=1,54060 \text{ \AA}$ y $\lambda_{Cu_{K\alpha_2}}=1,54439 \text{ \AA}$), goniómetro vertical (geometría Bragg-Brentano), rendija programable de divergencia, intercambiador automático de muestras, monocromador secundario de grafito y detector PixCel; perteneciente a los servicios generales de Rayos X de la UPV/EHU.

Las condiciones instrumentales utilizadas han sido:

- Corriente del generador: 40 KV y 40 mA.
- Barrido angular: 5-70° 2 θ

Es necesario tomar unos 50 mg de la muestra en polvo y depositarla sobre un portamuestras de de acero inoxidable.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión ha permitido la caracterización estructural y morfológica de las muestras mediante la adquisición de imágenes de las nanopartículas de hidroxiapatita dopada con hierro preparadas y de las nanopartículas de magnetita. A partir de estas imágenes se ha podido calcular el tamaño de las nanopartículas, su distribución de tamaños además de visualizar su forma y su estado de agregación.

Para visualizar las nanopartículas en el microscopio electrónico de transmisión es necesario preparar una suspensión diluida de éstas. A continuación, se toma una gota de esta suspensión con una pipeta Pasteur y por último se deposita sobre una rejilla de cobre donde la gota se deja evaporar. Una vez que la rejilla se secó se introduce en el microscopio. La elección del disolvente donde se suspenden las partículas es crítica ya que de ello depende su correcta visualización.

El disolvente debe ser de bajo punto de ebullición y estabilizar total o parcialmente a las nanopartículas para que, al evaporarse la gota, las partículas se depositen en la rejilla sin agregarse (Figura 2.1).

La visualización de las partículas se llevó a cabo en un microscopio de la marca Philips CM 120 Biofilter con módulo STEM, mapeado elemental y filtrado de imágenes mediante EELS de los servicios generales de la UPV /EHU; en la caracterización de las nanopartículas magnéticas empleadas.

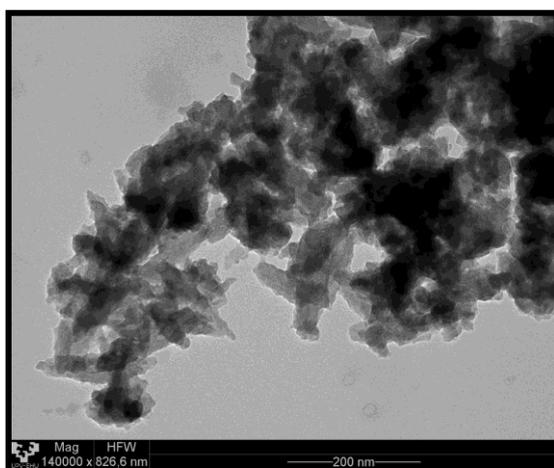


Figura 2.1. Nanopartículas de hidroxiapatita dopada con hierro que hemos sintetizado por el método de adición simultánea.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las micrografías obtenidas por SEM nos aportan información topográfica, morfológica, de composición química, de cristalografía, porosidad. Por este motivo hemos usado esta técnica tanto para caracterizar las nanopartículas sintetizadas (morfología, tamaño, estado de agregación de las partículas).

Se usó un microscopio electrónico de barrido (SEM) HITACHI S-3400 N de los servicios generales de la UPV/EHU.

La preparación de las muestras de nHAFé para el SEM se llevó a cabo depositando una pequeña cantidad de nanopartículas dispersadas en acetona.

Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas nHAFé y nFe₃O₄ fueron determinadas mediante la medida de sus curvas M-H usando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a 37°C (temperatura fisiológica); desarrollado por la Universidad del país Vasco, calibrado con níquel de una pureza de 99.995%. El rango del campo magnético fue de ± 1.8 T (18 kG), con una resolución de ± 20 μ T (0.2 G).

Se trata de conocer la respuesta magnética (M), su imanación de saturación (M_s), el valor de su campo coercitivo (H_C), al aplicar un campo magnético (H). Para la caracterización magnética se tomó una muestra en polvo (entre 5 y 10 mg) en el interior de una cápsula de gelatina. El polvo es compactado al fondo de la cápsula de gelatina al introducir algodón y así dejarlo inmovilizado. Por último, se coloca en una pajita de material que no da señal magnética y se introduce en el interior del magnetómetro.

2.3.- FABRICACIÓN DE SOPORTES POROSOS

Los materiales porosos existen en una amplia variedad de aplicaciones ingenieriles, fundamentalmente debido a sus buenas propiedades mecánicas, flexibilidad de diseños y elevada reproducibilidad. Los materiales porosos se pueden definir como una matriz sólida que contiene vacíos o huecos.

Los materiales utilizados para la fabricación de andamios fueron los siguientes:

- la poli- ϵ -caprolactona o PCL (Purac Biomaterials Purasarorb (Holanda))
- La poli-L-lactida o PLLA (Biomer L 9000 (Alemania)).
- 1,4-dioxano (Panreac p.a. ,pureza 99%, (Barcelona))
- Cloroformo (Panreac p.a. ,pureza 99%, (Barcelona))
- Nanohidroxiapatita (Sigma Aldrich, tamaño partícula <200 nm, peso molecular de 502,31 g/ml.)
- Magnetita nanopartículas (Sigma Aldrich, con tamaño partícula entre 50 y 100 nm).
- Ambos polímeros fueron purificados mediante disolución en cloroformo antes de su utilización. Mediante cromatografía de permeación de gel

(GPC) fueron caracterizados, obteniendo los valores recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 2.1. Distribución de pesos moleculares promedio en peso (M_w), el peso molecular promedio en número (M_n) y el índice de polidispersidad ($I=M_w/M_n$) de los polímeros.

Polímero	M_w	M_n	$I=M_w/M_n$
PCL	130490	79760	1.636
PLLA	144221	104042	1.386

Los andamios tridimensionales se fabricaron mediante separación de fases inducida térmicamente (TIPS) con una concentración óptima del 2,5% (w/v) polímero (PCL y PLLA) en 1,4-dioxano [82].

Las proporciones peso/volumen más óptimas para la fabricación de soportes porosos elegida fue un 2.5 % de polímero en relación a la cantidad de disolvente usado.

Para la preparación de nuestras muestras; en primer lugar se disuelve el polímero, en 1,4-dioxano y posteriormente añadimos las nanopartículas magnéticas. La disolución resultante es vertida en moldes de aluminio, previamente al proceso de liofilización templamos todas las muestras a -60°C para provocar la separación de fases y se extraía el disolvente mediante liofilización durante 7 días.

Tanto con el PLC como con el PLLA el protocolo experimental fue:

- 1º.- Se pesan tanto el polímero como las nanopartículas.
- 2º.- En un balón de reacción se vierte la cantidad de 1,4-dioxano necesaria para formar una disolución al 2,5 % (w/v).
- 3º.- El polímero se introduce en el balón junto con el disolvente y se disuelve mediante agitación magnética durante 2 horas y a una temperatura de 50°C para obtener una disolución homogénea. Durante los últimos minutos disminuimos la velocidad del agitador para evitar la formación de burbujas de aire.

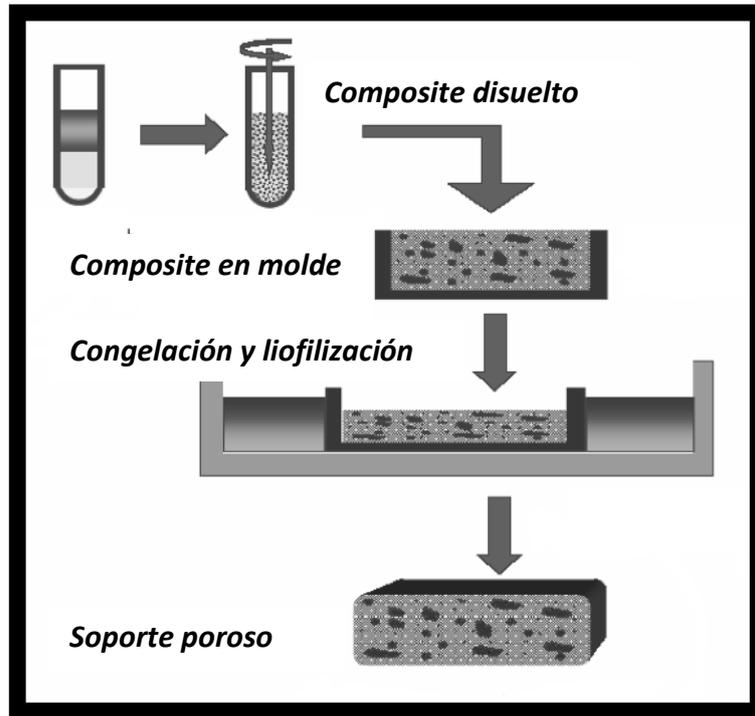


Figura 2 .2. Esquema de obtención de nuestros soportes porosos

4º.- Se vierte el polímero disuelto, en un vaso de precipitados donde hemos pesado previamente las nanopartículas y agitamos con un agitador manual y a la vez introducimos en el ultrasonido para homogeneizar las nanopartículas en el polímero. Posteriormente vertimos la disolución resultante en un molde de aluminio.

5º.- La separación de fases es probablemente la parte más delicada del proceso, como ha quedado demostrado en estudios anteriores [82]. En nuestro caso se optó por un enfriamiento a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, para ello los moldes con la disolución se introducen en la cubeta de un liofilizador (Telstar LioQuest 85), que ha sido previamente enfriado durante dos horas para facilitar el proceso de congelación.

6º.- Las muestras se sometieron a un ciclo completo de liofilización durante una semana.

Los andamios de PCL o PLLA fueron fabricados con las siguientes proporciones de nanopartículas magnéticas según recogen las Tablas 2.2 y 2.3:

Tabla 2.2.- Composiciones sintetizadas de PCL- nanopartículas magnéticas

Sistema PCL			
nHAFe		nFe ₃ O ₄	
%PCL	%nHAFe	%PCL	%nFe ₃ O ₄
90	10	95	5
80	20	90	10
70	30	85	15
30	70	80	20
20	80		

Tabla 2.3.- Composiciones PLLA/ nanopartículas magnéticas

Sistema PLLA			
nHAFe		nFe ₃ O ₄	
%PLLA	%nHAFe	%PLLA	%nFe ₃ O ₄
90	10	90	10
80	20	80	20
70	30	70	30
50	50	60	40
30	70	50	50
20	80	30	70

Se fabricaron también soportes porosos compuestos de ambos homopolímeros puros sin nanopartículas; para ayudarnos a evaluar y comparar el comportamiento de los soportes magnéticos sintetizados. El proceso de fabricación es básicamente el mismo, salvo que no se añade ni magnetita ni nHAFe.



Figura 2.3. Soportes porosos de PCL con 80, 70, 30, 10% de nHAFé de izda a dcha.



Figura 2.4. Soportes porosos de PCL con 20, 15 y 5% de nFe₃O₄ de izda a dcha.



Figura 2.5. Soportes porosos de PLLA con 10, 20, 30, 50 y 70% de nHAFc de izda. a dcha.



Figura 2.6. Soportes porosos de PLLA con 50, 30, 20 y 10% de nFe₃O₄ de izda. a dcha.

2.4.- CARACTERIZACIÓN DE SOPORTES POROSOS

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Mientras que el TEM permite el estudio de la morfología de muestras delgadas, el SEM posibilita conocer la morfología de la superficie de muestras gruesas, por ejemplo, en el caso de nuestros andamios poliméricos tridimensionales.

Mediante esta técnica se pueden observar la morfología, tamaño de los poros de nuestros andamios y si existe interconexión entre ellos. Por otro lado, es una técnica muy usada para ver el curso de la degradación como afecta a la morfología del poro.

La morfología de los andamios se evaluó mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM) HITACHI S-3400 N. Antes del análisis las muestras fueron metalizadas con una fina capa de oro en un metalizador Emitec K550X a 1200 V y 5 mA.

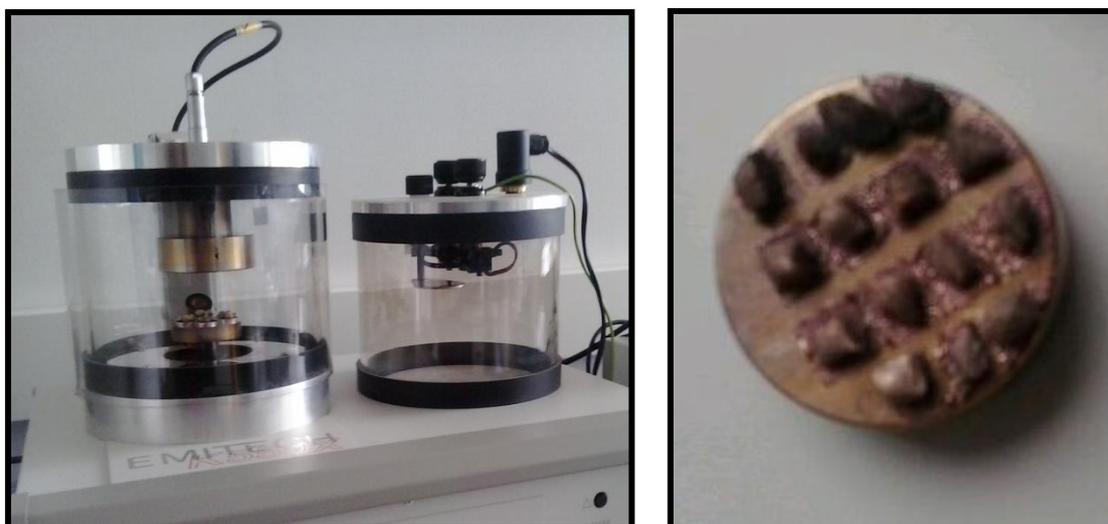


Figura 2.7. Muestras en el metalizador a la izda y muestras metalizadas en el portamuestras a la dcha.

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Se registró el espectro de absorción en el infrarrojo de las muestras mediante un espectrómetro de Transformada de Fourier (FTIR, Thermo Scientific Nicolet Avatar 370), equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR,

Pike Smart MIRacle) y un cristal ZnSe. Se realizaron barridos entre 4000 y 650 cm^{-1} a una resolución de 4cm^{-1} .



Figura 2.8.- FTIR Thermo Scientific Nicolet Avatar 370 equipado con ATR, Pike Smart MIRacle

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las características térmicas de los polímeros se determinaron mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC, Q200 de TA Instruments) equipado con un enfriador para poder alcanzar temperaturas de -90°C . Se utilizaron muestras de entre 5 y 9 mg que fueron encapsuladas en crisoles de aluminio. Como gas de purga se empleó nitrógeno con el fin de evitar la degradación termo-oxidativa de las muestras durante los experimentos. Los barridos se han realizado con ratios de calentamiento y de enfriamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.



Figura 2.9.- Calorímetro Q200 de TA Instruments

Para la PCL el rango de temperaturas fue de -90 a 120°C y para la PLLA de 0 a 220°C.

La primera rampa de calentamiento:

- composites de PCL: desde -90 hasta 120
- composites de PLLA: desde 0 hasta 220

Durante esta rampa, el material muestra información de su estado físico y morfológico actual. Esta rampa es usada para evaluar el calor de fusión, ΔH_m , la temperatura de fusión, T_m , la temperatura de transición vítrea, T_g , la temperatura, T_c , y la entalpía de cristalización, ΔH_c , del material.

Propiedades Magnéticas (VSM)

Las propiedades magnéticas de los composites magnéticos fueron determinadas mediante la medida de sus curvas M-H usando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a 37°C (temperatura fisiológica); desarrollado por la Universidad del país Vasco.

Se tomó una muestra de cada composite entorno a unos 15 mg y se fijó mediante teflón a una varilla de vidrio. Se coloca la varilla en el VSM. Se resta la señal del vidrio a la señal de la muestra.

Cromatografía de Permeación de Gel (GPC)

Se determinó peso molecular promedio en peso (M_w), peso molecular promedio en número (M_n) e índice de polidispersidad ($I=M_w/M_n$), mediante el uso de un cromatógrafo de permeación de gel (GPC, Perkin Elmer 200). Para ello las muestras fueron disueltas en tetrahidrofurano (THF) al 2% y se utilizó un refractómetro diferencial Perkin Elmer 200 como detector. La calibración se realizó de acuerdo a los estándares del poliestireno con un caudal de 1 ml/min. Se utilizaron cuatro columnas Phenogel (Phenomenex) en serie con un tamaño de partícula de 5 μm .

2.5.- ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se utilizan para evaluar los posibles efectos tóxicos de un material sobre células vivas. Entre los diferentes ensayos que se pueden utilizar para realizar esta medida está el ensayo reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), que es el utilizado en este estudio. Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados por Sylvie Ribeiro (Universidad de Minho) y por Senentxu Lanceros-Mendez (BCMaterials, Universidad de Minho).

Se utilizaron las células C2C12 (subclon de los mioblastos de ratón) por su fácil manejo y rápida proliferación y esto permite que la utilización de esta línea de cultivo en investigación sea más fácil.

La evaluación indirecta de la citotoxicidad de las muestras conforme a la norma ISO 10993 parte 5, se realizó según el siguiente protocolo:

1º Se cortaron y esterilizaron por UV durante 1 hora cada lado membranas con $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$.

2º Cada muestra fue lavada 5 veces con disolución tampón fosfato (PBS), durante 5 minutos.

3º Las muestras fueron inmersas en una placa de cultivo de 24 pocillos de poliestireno con DMEM conteniendo glucosa (Gibco) 4.5 g.L^{-1} suplementada con un 10% de FBS (Biochrom) , además de un 1% P/S (Biochrom), a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en aire con un 95% de humedad con un contenido de un 5% de CO_2 . Fueron incubadas durante 24 horas.

4º Simultáneamente, células C2C12 se sembraron en la placa de cultivo de tejido de poliestireno de 96 pocillos con una densidad de 2×10^4 células. mL^{-1} e incubadas durante 24 h, para permitir la unión de células a la placa.

5º Después de este tiempo, el medio de cultivo de la placa de poliestireno de 96 pocillos se eliminó y se añadieron los medios de extracción preparados (de nuestras muestras) a los pocillos (100 μl).

6º Posteriormente, se incuban las células durante 24 y 72 horas.

7º Después de cada tiempo se cuantificó la evaluación de la viabilidad celular.

Se utilizó un 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich) como control positivo y se empleó el medio de cultivo celular como control negativo.

El ensayo MTT mide la actividad mitocondrial de las células, lo que refleja el número de células viables. En cada intervalo temporal, se retiró el medio de cada pocillo y se añadió medio fresco que contenía solución de MTT al 10% (solución madre de 5 mg MTT.mL⁻¹ en PBS, Sigma Aldrich). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán (de color púrpura) producido. Después de 2 h de incubación, los cristales de MTT se disolvieron con DMSO y la densidad óptica se midió a 570 nm. De cada soporte poroso se tomaron cuatro muestras.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó a partir de la fórmula:

$$\text{Viabilidad Celular}\% = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del control negativo}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.6.- ESTUDIO DE DEGRADACIÓN *IN VITRO*

En la realización del estudio de degradación se utilizaron andamios de los dos homopolímeros, con ambas nanopartículas magnéticas; fabricados como se detalla en el apartado 2.3.

Se ha realizado el estudio de degradación de los siguientes sistemas:

- PCL/nHAFé con proporciones 10, 30, 70 y 80%.
- PCL/nFe₃O₄ (magnetita) con proporciones 5% y 10%
- PLLA/nHAFé con proporciones 10, 20, 30 y 70%.
- PLLA/nFe₃O₄ (magnetita) con proporciones 10, 30, 50 y 70%.

Las muestras fueron cortadas en trozos rectangulares de unos 0,5 cm² y peso similar. Tras ser pesadas se introdujeron en tubos de ensayo idénticos que contenían 10 ml de solución tampón salina (PBS) suministrada por FLUKA ANALYTICAL (Sigma Aldrich, EEUU) con un pH de 7,2, sumergiéndolas por completo. La degradación tuvo lugar en una estufa termostaticada a 37 °C y en condiciones estáticas.

Transcurridos las semanas de degradación establecidas, las muestras eran extraídas de los tubos de ensayos, retirándose con cuidado la humedad superficial y pesándolas para determinar la absorción de agua. Las variaciones en el pH de la solución tampón fueron determinadas utilizando un pH-metro PCE 228 (Instrumentos PCE, España) y corregidas por temperatura. Finalmente las muestras se dejaron secar varias semanas en estufa durante las cuales fueron regularmente pesadas hasta que su peso se estabilizó. Así se pudo determinar el peso en seco tras la degradación.

El porcentaje de agua absorbida ($W_a\%$) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$W_a\% = \frac{W_w - W_r}{W_r} \times 100 \quad (2.2)$$

donde W_w es el peso de la muestra tras retirar el agua superficial y W_r es el peso residual de la muestra seca después de la degradación.

El porcentaje de pérdida de masa ($W_L\%$) se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$W_L\% = \frac{W_0 - W_r}{W_0} \times 100 \quad (2.3)$$

donde W_0 es el peso inicial de la muestra.

Capítulo 3

Estudio de nHAFe

Estudios *in vitro* han demostrado que las nanopartículas de HAFe; solas o combinadas con ácido poli (L-láctico) o poli (ϵ -caprolactona); influyeron positivamente en las células tipo osteoblasto y en la viabilidad de las células madre mesenquimales.[83-86].

Las nHAFe son biocompatibles, biodegradables y capaces de moverse por un campo magnético externo [81, 83, 87]. Por ello este nuevo nanosistema superparamagnético puede representar una alternativa novedosa a las SPION para configurar dispositivos magnéticos, estimular aplicaciones nanomédicas personalizadas, tales como: nano-portadores y andamios para liberación de fármacos dirigidos para ingeniería de tejido óseo con multi-funcionalidades controladas a distancia [86].

En los últimos años, se están desarrollando apatitas nanocristalinas similares a las presentes en las apatitas biológicas; denominándose biomimetic nanocrystalline apatites (BNA).con las siguientes características principales:

- Composición no estequiométrica.
- Presencia de los iones CO_3^{2-} y HPO_4^{2-} .
- Los nanocristales irregulares con forma de placa alargadas a lo largo del eje c de la estructura hexagonal de la apatita [88,89].
- Capa hidratada sobre la superficie del cristal [89].

3.1.- DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Se emplearon distintas técnicas para caracterizar el material obtenido mediante síntesis. Todas ellas han sido previamente descritas en el apéndice I Técnicas Experimentales, y todas son básicas para conocer las propiedades estructurales, morfológicas y magnéticas del producto en cuestión.

Wang y colaboradores sugieren que los parámetros de red aumentan mientras que la cristalinidad disminuye en la HA al aumentar los iones hierro [87].

La difracción de rayos X en polvo (XRD) da el patrón esperado de nanopartículas de HA (Figura 3.1, picos marcados con círculos). La nHAFé sintetizada a 60°C tiene un contenido muy alto de magnetita, como se deduce de la intensidad de las reflexiones características marcadas con un asterisco; no se encontraron picos de ninguna tercera fase. Verificándose que el aumento de temperatura de síntesis produce un incremento de la cristalinidad tanto de la magnetita como de la hidroxiapatita; aumentando por otro lado la cantidad de magnetita formada como se puede apreciar en los picos de magnetita $2\theta \approx 36^\circ$ y $2\theta \approx 30^\circ$ [81].

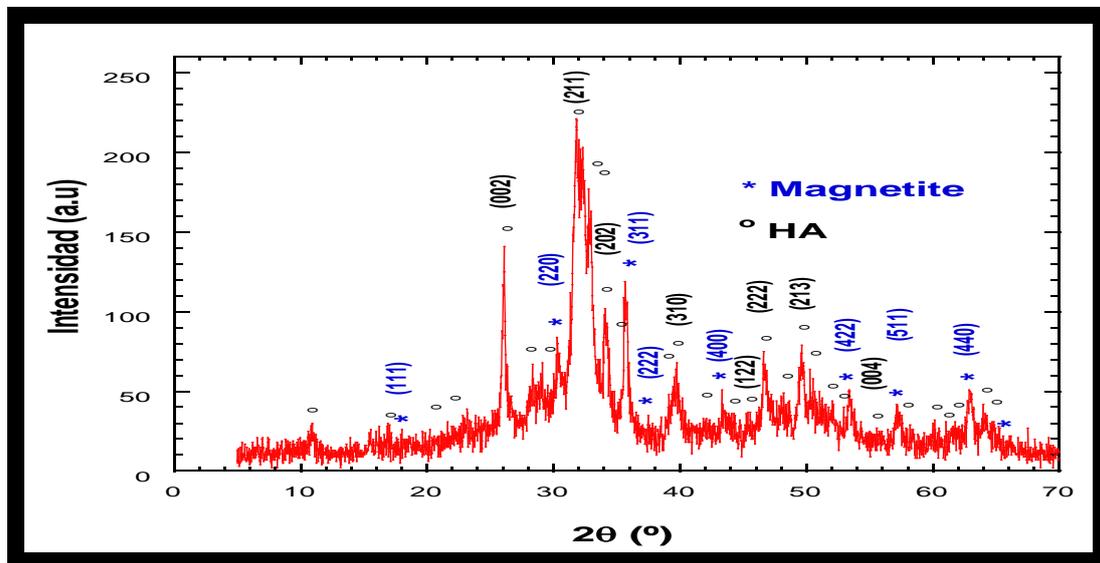


Figura 3.1.- Difractograma de nHAFé sintetizada, (*) picos de magnetita, (o) picos de HA.

Tabla 3.1: Picos de difracción de rayos X (DRX) característicos de la magnetita (Fe_3O_4) como fase minoritaria, presente en la nHAFé sintetizadas.

2θ (grados)⁽¹⁾	35,42	62,51	56,95	30,10	43,05	53,39	37,66	18,15
Intensidad⁽¹⁾	100	40	30	30	20	10	5	5
Índices (hkl)⁽¹⁾	311	440	511	220	400	422	222	111
Ángulo 2θ en nHAFé	35,65	62,86	57,2	30,21	43,35	53,65	37,53	18,02

⁽¹⁾ Referencia: JCPDS-ICDD Carta 19-629 Radiación CuK α .

Se observa que los sitios y la intensidad de los picos de difracción son consistentes con el patrón estándar para la tarjeta JCPDS N° (25-166) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ y con la JCPDS N° (19-629) Fe_3O_4 .

Se puede observar que la sustitución de Fe en la red de HA no distorsiona notablemente la estructura [83, 86]. El Fe^{2+} y el Fe^{3+} ocupan diferentes posiciones del Ca^{2+} en el retículo de HA, de modo que los iones Fe no están situados en la posición intersticial de la celda sino en la posición de sustitución de Ca [81, 83, 86, 90].

El ensanchamiento y la reducción de intensidad de los picos de difracción se deben a una mayor tensión en la red a partir de la sustitución de hierro, ya que el radio de Ca^{2+} es mayor que el de Fe^{2+} y Fe^{3+} . La posición e intensidad del pico del plano (211) depende en gran medida del estado de oxidación del hierro [91].

Utilizando los datos obtenidos gracias a las medidas XRD; mostrados en la Figura 3.1. El tamaño de cristal de las nanopartículas se determinó empleando la fórmula de Scherrer [92]. El software utilizado para el cálculo de D fue FULLPROF [93], obteniendo mediante este programa la anchura a media altura del pico de difracción (FWHM) (ver Figura 3.2).

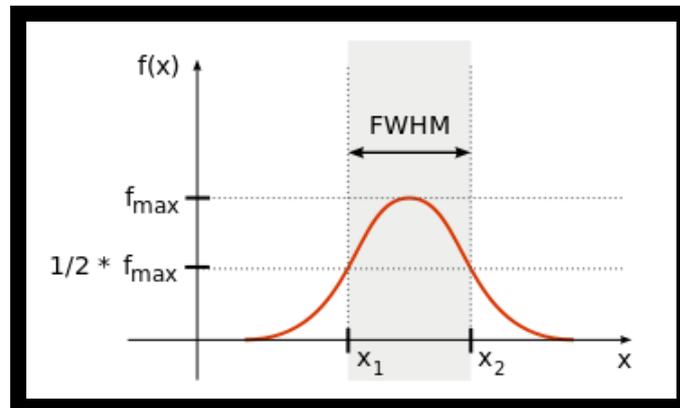


Figura 3.2.- Anchura a media altura del pico de difracción (FWHM)

El tamaño cristalino de las partículas (XRD) de nHAFé se calculó a partir de la anchura del pico (211) que es el pico que posee mayor intensidad.

El valor del tamaño de partícula extraído por esta técnica, en torno a unos 30 nm de media, puede estar afectado de errores sistemáticos, como ya ha sido

indicado por otros autores [94]. Por lo tanto, para poder obtener medidas más precisas del tamaño y morfología [95] de las nanopartículas, se empleó la microscopía electrónica de transmisión (TEM).

3.2.- MORFOLOGÍA DE LAS PARTÍCULAS MEDIANTE TEM Y SEM

La morfología de las nanopartículas sintetizadas fue investigada usando TEM y SEM, revelando un gran número de puntos negros que corresponden a inclusiones de fases ricas en hierro [86] y partículas con morfología aciculada, bastante heterogéneas respecto al tamaño, con anchuras alrededor de 25 nm y longitudes entre 100 y 150 nm (Figura 3.3) como era de esperar para una apatita biomimética nanométrica [86, 89].

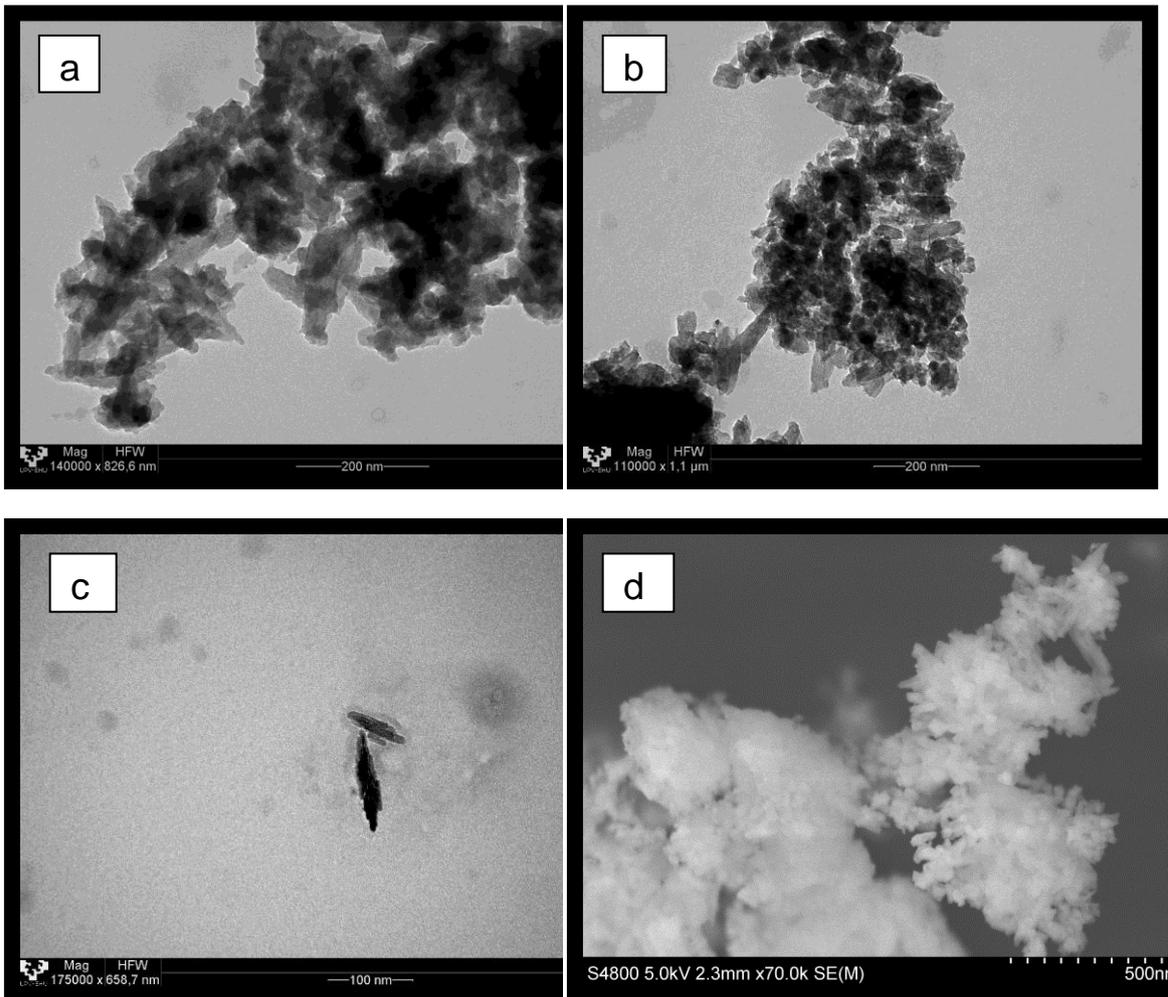


Figura 3.3.- Micrografías TEM a), b) y c) y SEM d) mostrando las nanopartículas de de HAp.

La nHAFe mostró una gran tendencia a formar agregados; lo que se atribuyó a la gran cantidad de iones externos (es decir, Fe^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-}) que causan distorsión de la red cristalina, reducción de la regularidad periódica de largo alcance y posibles modificaciones de la energía superficial. El mayor desorden estructural puede inducir la formación de partes casi amorfas, especialmente en la superficie, causando unión y adhesión de cristales mediante interacciones inter-cristalinas durante la síntesis o en la post-síntesis, durante el secado [86, 89].

El menor tamaño iónico del hierro comparado con el calcio ayuda en el proceso de nucleación, evitando el engrosamiento de los cristales, obteniéndose cristales más finos [96].

3.3.- PROPIEDADES MAGNÉTICAS (VSM)

Mediante el magnetómetro de muestra vibrante se realizó la caracterización magnética de las partículas de nHAFe y magnetita a 37°C (temperatura fisiológica). Es decir, se trata de conocer su respuesta magnética (M), su imanación de saturación (M_S) y el valor de su campo coercitivo (H_C) al aplicar un campo magnético (H) a temperatura fisiológica.

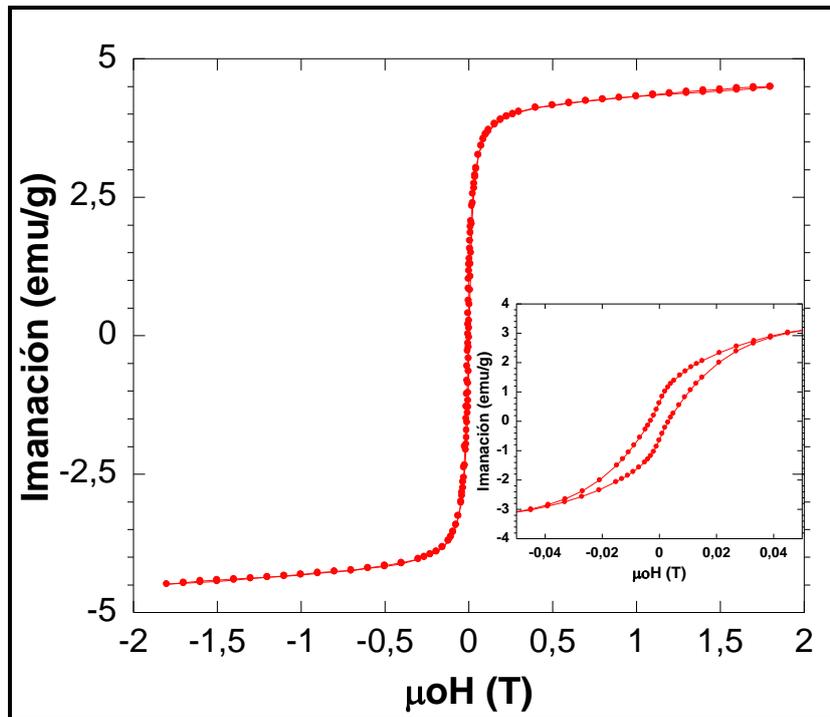


Figura 3.4.-Curva de imanación de nHAFe. Inserto: ampliación del ciclo de histéresis

El ciclo de histéresis Figura 3.4, presentó forma de “cintura de avispa”, lo que indica la presencia de fases ferrimagnéticas de diferentes coercitvidades o combinación de granos de dominio simple (SD) y granos superparamagnéticos (SP).

Tauxe y colaboradores [97], examinando los ciclos de histéresis wasp-waisting (cintura de avispa) llegan entre otras a las siguientes observaciones :

1. puede ser fácilmente generados por poblaciones de granos monodominio y superparamagneticos (SP).
2. se requiere una contribución SP que satura rápidamente generando un empinado ciclo inicial.

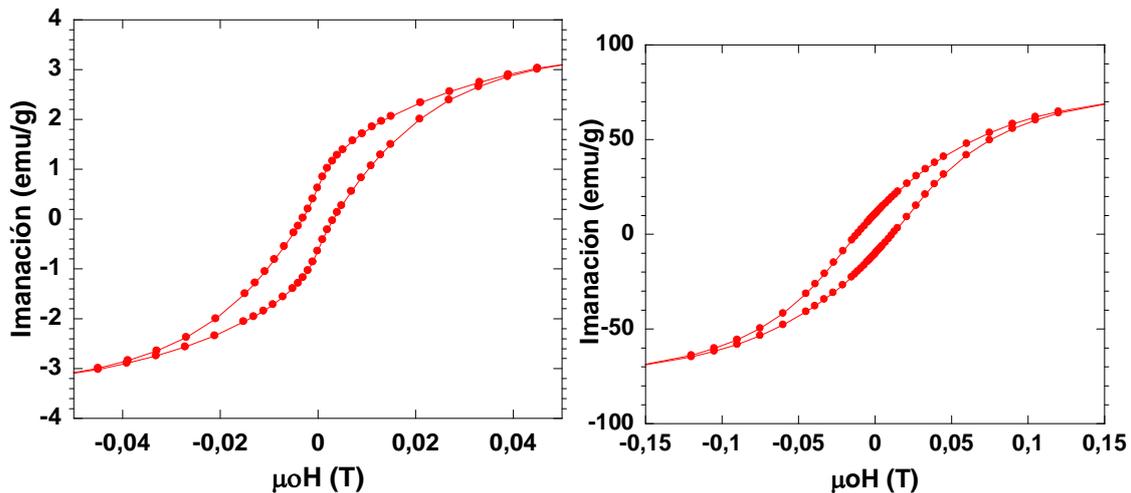


Figura 3.5.- Ampliación de los ciclos de histéresis de las nanopartículas utilizadas, se observa claramente la forma de cintura de avispa en la nHAFe ($n\text{HAFe}+n\text{Fe}_3\text{O}_4$) a la izquierda frente a $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ a la derecha

Zilm y colaboradores estudiaron como las propiedades magnéticas en las apatitas dopadas con hierro, se ven afectadas por el estado de oxidación del hierro y por el tamaño de partícula, la sustitución de Fe^{2+} y Fe^{3+} ; con tamaño similar a las nuestras y forma aciculada; presentaron propiedades superparamagnéticas [91].

El valor de imanación de saturación de la nHAFe a 1.5 T fue de 4,45 emu / g, confirmando la propiedad magnética debida a la sustitución de hierro en la red de iones de HA [6]. En las nanopartículas, el valor del campo coercitivo, ≈ 3 mT (≈ 30 G), era bajo, pero no lo suficientemente bajo como para surgir el comportamiento superparamagnético (SPM) puro, no interactivo de las partículas de Fe. Mientras que el tamaño de las partículas puede justificar el magnetismo de SP en partículas aisladas, la interacción de partículas dio lugar al comportamiento ferromagnético del compuesto, lo que también se confirma por la rápida saturación de las curvas.

3.4.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Los espectros de FTIR fueron utilizados para identificar los grupos funcionales de las nanopartículas de HAFe sintetizadas además ofrecen información adicional sobre la composición y características estructurales de las partículas de nHAFe [98]. Esta técnica permitió detectar la presencia de la fase magnetita en el nanomaterial sintetizado.

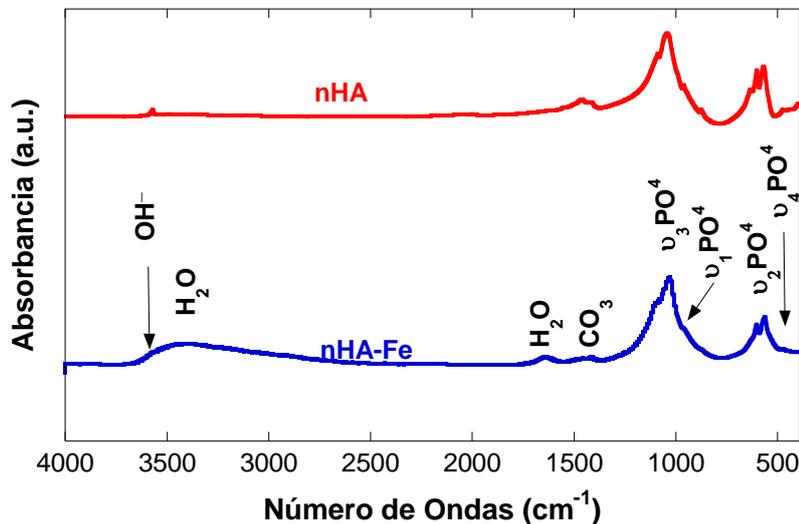


Figura 3.6.- Espectro (FTIR) correspondiente a nHAFe y nHA

En las Figuras 3.6 y 3.7 se muestra el espectro infrarrojo de las nanopartículas sintetizadas con el objeto de determinar posibles interacciones. La nHAFe

mostró las mismas bandas de absorción que HA. La presencia de hierro no parece haber influido en el enlace químico dentro de la estructura de la apatita [96].

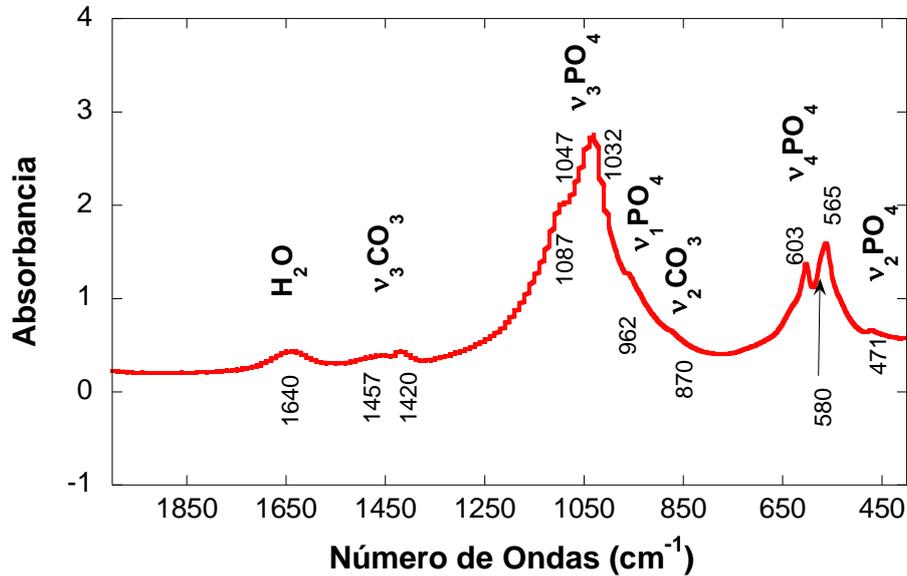


Figura 3.7.- Espectro (FTIR) correspondiente a nHAFe

Nano-hidroxiapatita dopada con hierro (nHAFe):

Las bandas de absorción características para la nHAFe se presentan en la Tabla 3.2:

Número de Ondas (cm ⁻¹)	Grupo	Observación
3560	-OH	Vibración de estiramiento de grupos OH
3450	H ₂ O	Vibración de deformación del H ₂ O de cristalización
1640	H ₂ O	Vibración de deformación del H ₂ O de cristalización
1457	CO ₃ ²⁻	Vibración característica de apatita carbonatada Tipo B
1420	CO ₃ ²⁻	Vibración característica de apatita carbonatada Tipo B
1087	-PO ₄ ³⁻	Vibración de estiramiento del grupo -PO ₄ ³⁻
1047	-PO ₄ ³⁻	Vibración de estiramiento del grupo -PO ₄ ³⁻
1032	-PO ₄ ³⁻	Vibración de estiramiento del grupo -PO ₄ ³⁻
962	-PO ₄ ³⁻	Vibración de estiramiento del grupo -PO ₄ ³⁻
870	CO ₃ ²⁻	Vibración característica de apatita carbonatada Tipo B
603	-PO ₄ ³⁻	Vibración de deformación del grupo -PO ₄ ³⁻
580	-PO ₄ ³⁻	Vibración de estiramiento del grupo -PO ₄ ³⁻
565	-PO ₄ ³⁻	Vibración de deformación del grupo -PO ₄ ³⁻
580-565	Fe-O	Deformación de los sitios octaédricos y tetraédricos
471	-PO ₄ ³⁻	Vibración de deformación del grupo -PO ₄ ³⁻

La banda ancha observada a 3450 y 1640 cm^{-1} indica la absorción de agua en la celda cristalina [99-102]. Además, la banda de hidroxilo a 3560 cm^{-1} se redujo a un hombro en la banda de agua para HAFe.

Las bandas de absorción a 580, 962, y 1032 cm^{-1} y las de 471, 565, y 603 cm^{-1} son atribuidas al modo de estiramiento y al modo de deformación del PO_4^{3-} en la HA, respectivamente

Aparecen bandas anchas a longitudes de onda de 870 (ν_2), 1420 y 1457 cm^{-1} (ν_3) asignables a las vibraciones CO_3^{2-} características de la mayoría de las apatitas carbonatadas de tipo B (esto es, CO_3^{2-} sustituyendo a PO_4^{3-}) también estaban presentes [4,18,19]. La muestra no mostró la banda de absorción típica a 1540 cm^{-1} que se encuentra en las apatitas carbonatadas de tipo A [103-106].

Los picos de las partículas de óxido de hierro correspondientes a la vibración de los sitios octaédricos y tetraédricos del enlace Fe-O, no aparecieron ya que las absorciones a 575 y 580 cm^{-1} están enmascaradas por los picos del HA [107].

Capítulo 4

Caracterización del sistema PCL-NPMs. Estudio de degradación

En la bibliografía existen algunos estudios que han analizado la evolución de las propiedades de andamios de PCL durante la degradación *in vitro* [108-118]. En estos estudios se trata de reproducir las condiciones del interior del cuerpo humano mediante la utilización de soluciones como el tampón fosfato salino (PBS) o, como el fluido corporal simulado (SBF), para mantener un pH estable. Los andamios se sumergen en estas soluciones durante ciertos intervalos, mientras se mantienen a temperatura fisiológica (37°C).

En este capítulo de la memoria se analizarán el comportamiento frente a la degradación *in vitro* en una solución salina de pH 7,2 durante 28 semanas a 37°C del sistema PCL-nHAFé y de PCL-nFe₃O₄ en el primer y segundo apartado respectivamente.

Algunas conclusiones derivadas del estudio de la degradación *in vitro* de estos sistemas ofrecen información muy interesante sobre el comportamiento *in vivo* de este material, siendo un paso esencial en la caracterización de un dispositivo para la ingeniería de tejidos. Aunque, los resultados *in vitro* no se pueden extrapolar directamente a las condiciones *in vivo*.

4.1.- SISTEMA PCL-nHAFé. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN *IN VITRO*.

En los soportes porosos realizados hemos incorporado partículas bioactivas de nHAFé, con proporciones, 0, 10, 30, 70 y 80 % del total de la masa del polímero, durante 28 semanas. Cada 1, 5, 8, 10, 12, 16, 20, 25, y 28 semanas hemos ido sacando las muestras para realizar los estudios de degradación *in vitro*: absorción de agua, pérdida de peso y masa molecular, polidispersidad,

pH del medio, morfología, características químicas, propiedades térmicas y propiedades magnéticas.

Hemos incluido composiciones como la de un 70% de nHAFé, con el fin de obtener un andamio que se asemeja a la composición química del tejido óseo, la proporción en peso entre la fase mineral y la fase orgánica está entorno al 70/30 % en peso [119].

Otros autores [85, 120] han desarrollado un procedimiento sintético para obtener una HA magnética sustituida por (Fe^{2+} , Fe^{3+}), pero, no han estudiado la degradación in vitro.

4.1.1.-Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El TEM permite el estudio de la morfología de muestras delgadas, mientras que el SEM posibilita conocer la morfología de la superficie de muestras gruesas, por ejemplo, en el caso de nuestros andamios poliméricos tridimensionales.

La preparación de las muestras consiste en su metalización que, además de hacer conductora la superficie, permite eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica.

La porosidad de poros abiertos interconectados es un parámetro vital, permite la infiltración celular en el interior del material, el intercambio iónico con el medio, la adhesión, diferenciación y proliferación de células que formarán el nuevo hueso, así como la vascularización [109, 121]. Una mayor porosidad abierta mejora la osteogénesis, esta teoría ha sido verificada por numerosos estudios [109, 122-124].

La morfología de la microestructura de los andamios de PCL con distintos porcentajes de nHAFé sin degradar se muestra en la Fig. 4.1(c), (e), (g), (i) se puede observar que los poros en el armazón están uniformemente distribuidos y bien interconectados con tamaños en el intervalo de 150-40 μm . El grado de interconectividad de los andamios porosos es más significativo que el tamaño de los poros, ya que la red vascular necesita para la nueva adhesión y

formación ósea de una excelente interconexión [109, 125]; que facilitará una mayor disponibilidad de nutrientes y oxígeno. [109, 126, 127].

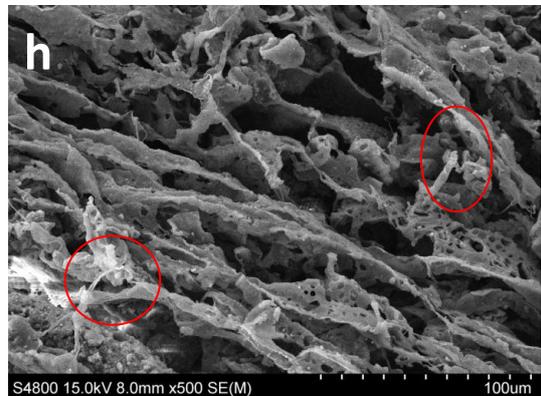
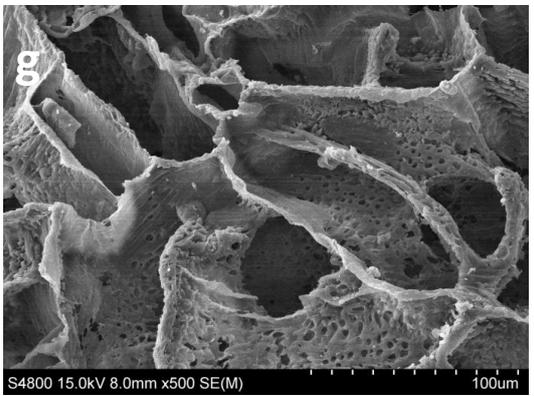
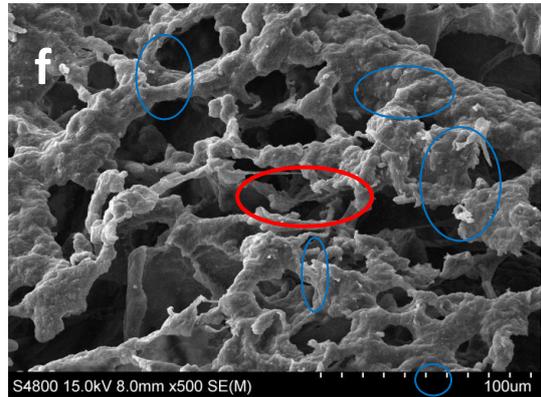
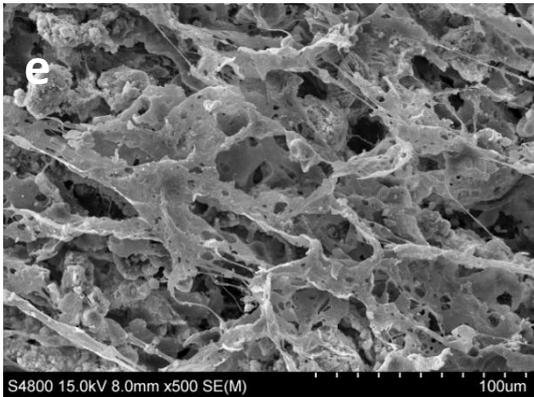
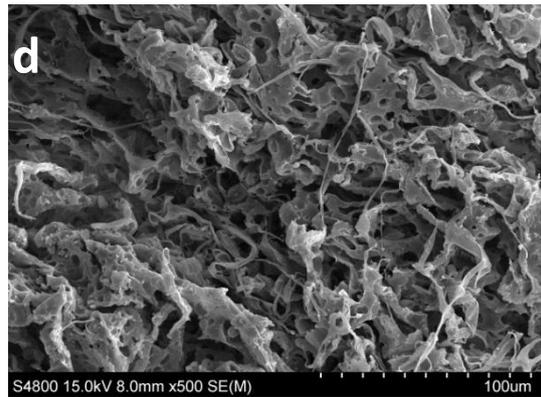
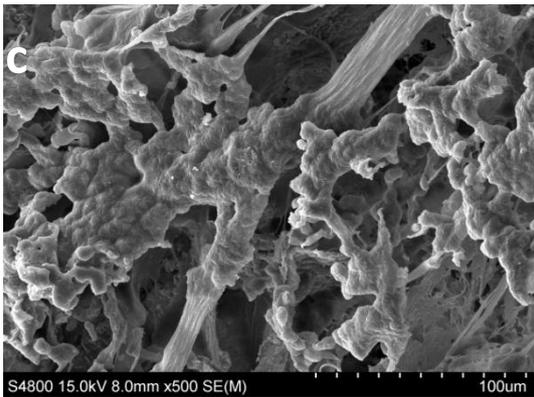
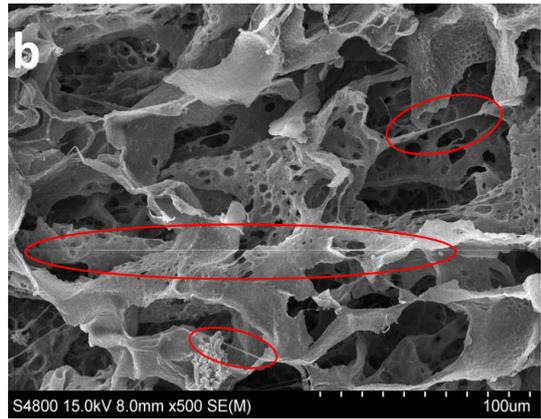
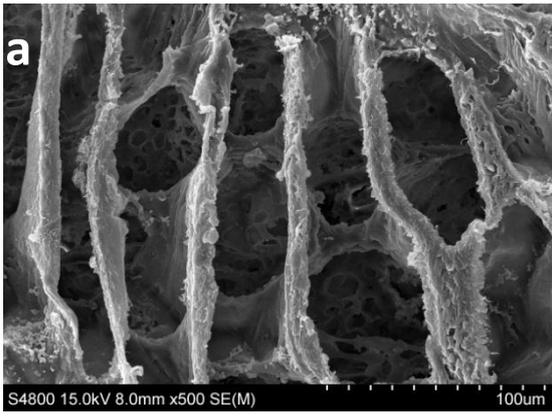
Estos andamios no poseen una morfología anisotrópica con morfología tubular con estructura interna similar a la de una escalera, típica de la separación sólido-líquido; por lo tanto la separación de fases que origina la formación de estos andamios será líquido-líquido [128-131].

Por otro lado, entre los dos tipos de separación líquido-líquido; nos decantamos por el mecanismo de nucleación y crecimiento por el tamaño de poro no muy grande, pero altamente conectados; concretamente nucleación heterogénea provocada por la presencia de las nanopartículas. Poros de menor tamaño son obtenidos mediante un temple rápido usando la técnica de liofilización [128-131]. En nuestro caso, nos vimos obligados a asegurarnos de que esto fuera así, porque de lo contrario se producía la precipitación de las nanopartículas en el fondo del andamio.

La inclusión de nHAFé, partículas bioactivas, en pequeñas cantidades, hace que éstas actúen como agentes nucleantes [132]. Cuando se añaden porcentajes menores del 30%, no parece afectar al tamaño de poro 4.1 (c). Aunque se produce en general, una disminución del tamaño de los poros, al aumentar el porcentaje de nanopartículas, como se puede observar en la Figura 4.1 (e).

Al aumentar el contenido de nHAFé, se puede apreciar una apariencia más fibrosa, Figura 4.1 (g), (i), parece como si los poros hayan sido estirados, apareciendo microporos en las paredes de estas muestras.

La morfología de los andamios con la adición de grandes cantidades de nanopartículas de HAFé provoca la formación de un poro más pequeño, sus paredes se engrosan y producen una morfología más irregular (véase la Figura 4.1). Estos cambios se producen porque las nanopartículas perturban la cristalización del disolvente y modifican el patrón de crecimiento de cristales haciéndolos más irregulares [128, 129, 133]. El resultado es una estructura más irregular e isotrópica y con poros más pequeños.



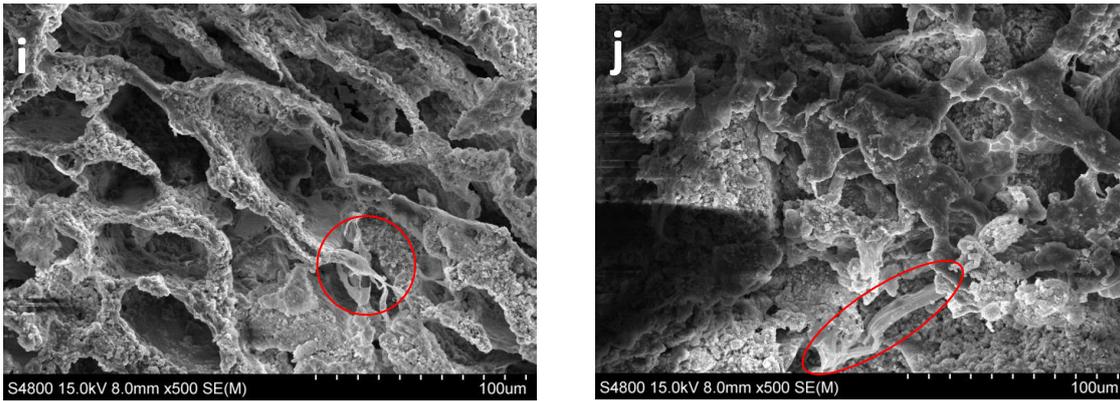


Figura 4.1.-Micrografía SEM de la morfología superficial del PCL. (a) PCL antes de degradar. (b) PCL después de 8 semanas de degradación “in vitro”. (c) PCL/10 %nHAFe antes de degradar. (d) PCL/10% nHAFe después de 28 semanas de degradación “in vitro” (e) PCL/30% nHAFe antes de degradar. (f) PCL/30% nHAFe después de 28 semanas de degradación “in vitro”. (g) PCL/70%nHAFe antes de degradar. (h) PCL/70% nHAFe tras 28 semanas de degradación “in vitro” (i) PCL/80% nHAFe sin degradar. (j) PCL/80% nHAFe después de 28 semanas de degradación. Círculos rojos señalando fibras, círculos azules cristales de hidroxiapatita

La porosidad de los andamios es de gran importancia en el comportamiento de su degradación. La alta porosidad, con una gran superficie específica podría, por una parte, aumentar la velocidad de hidrólisis y producir grandes cantidades de subproductos ácidos. Por otro lado, una buena porosidad del andamio, que permite una estructura de poros interconectada, podría facilitar que los subproductos ácidos, responsables del proceso de degradación autocatalítica, se difundan fácilmente fuera del andamio. La alta porosidad proporciona una mejor interconectividad de los poros, reduciendo la acumulación de iones de hidrógeno y provocando una velocidad de degradación más lenta [134].

Después de 28 semanas de degradación en PBS a 37° C, la morfología de los andamios PCL no mostró diferencias visuales en comparación con el día 1 del experimento. La estructura era aún suave y libre de defectos (véase la Figura 4.1). La observación SEM reveló cambios apreciables en la morfología de la superficie de estas muestras y se observaron microporos en las paredes de los andamios degradados de 28 semanas. Por otro lado, se puede apreciar un cambio en la morfología de la superficie, que pasa de tener un aspecto suave a

ser más rugosa, ver Figura 4.1 (d), (f) y (h). Este aspecto podría ser debido a la formación de cristales de hidroxiapatita formados durante la inmersión en PBS; en general, el mecanismo de formación de la hidroxiapatita es la reacción de disolución-precipitación, comienza con la disolución parcial de los iones de calcio de la nHAFé y luego reacciona con los iones de fosfato del PBS para formar cristales aciculados de hidroxiapatita [134]. Aunque, no aparecen productos de degradación, si podemos observar alguna partícula de nHAFé en las partes visibles de las paredes de los andamios. Podemos concluir, partiendo del análisis de los resultados experimentales de SEM que no había evidencia morfológica de la degradación del andamio, a excepción del tamaño de poro más pequeño que si hemos podido observar.

4.1.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopia Infrarroja, FTIR

La utilización de un ATR nos permitió realizar los espectros sin modificar la estructura de nuestros andamios, al no requerir las muestras ningún tipo de preparación.

El análisis FTIR se utilizó para determinar las bandas típicas relativas a los grupos funcionales presentes en la hidroxiapatita y en el polímero; y también para estudiar la posible interacción entre las fases orgánica e inorgánica en los andamios. Además esta técnica permite caracterizar las muestras de polímeros sometidas al proceso de degradación.

En el apartado 3.4 hemos realizado el estudio de las bandas representativas de la nHAFé (ver Figura 3.7). En la Figura 4.2 se recogen las bandas características del polímero puro sin nanopartículas.

En la Figura 4.3 se presentan los espectros FTIR-ATR de los andamios estudiados, el de PCL puro y la nanopartículas utilizadas en la fabricación de esta serie. Si observamos el espectro podemos ver que no hay aparentemente ninguna banda de absorción que haya alterado su posición, por lo que podemos decir que el polímero no ha interactuado químicamente con la nHAFé, sino que ésta se encuentra dispersa de forma homogénea. Esta

afirmación confirma las observaciones realizadas en el apartado anterior (SEM).

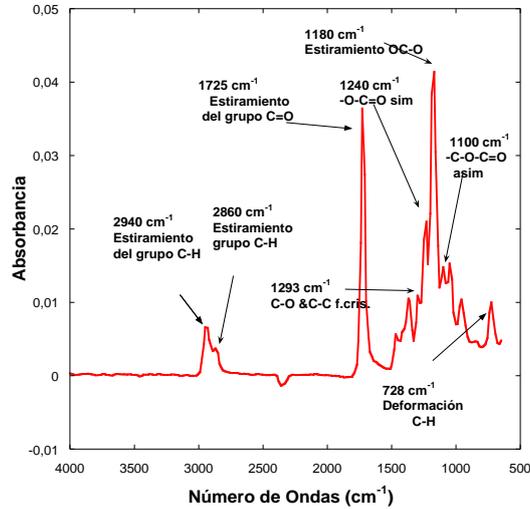


Figura 4.2.-Espectro (FTIR) correspondiente a PCL puro

Mediante este análisis se confirma además la incorporación del relleno inorgánico (HAFe) a la matriz orgánica del material (PCL), a través de la combinación de bandas características de la estructura de esta nanopartícula en los espectros correspondientes como se puede ver en la Figura.4.2. y 4.3.

Se observaron bandas vibratorias acentuadas, típicas de hidroxiapatita:

- Las correspondientes a grupos fosfatos: $\nu_3(1087,1047,1032 \text{ cm}^{-1})$, $\nu_1(962 \text{ cm}^{-1})$ y $\nu_4(603 \text{ cm}^{-1})$
- Las correspondientes a grupos carbonatos en posiciones del grupo fosfato: $\nu_3(1457 \text{ y } 1420 \text{ cm}^{-1})$ y $\nu_2(870 \text{ cm}^{-1})$

Las absorciones de carbonato demuestran que el material sintetizado es nanohidroxiapatita carbonatada. La posición de las bandas de carbonato indica que se trata de una hidroxiapatita de tipo B [135, 136].

Por otro lado, las señales de fosfato son amplias, lo que significa una rica variedad de microambientes que resultan de un pequeño tamaño de cristal [135].

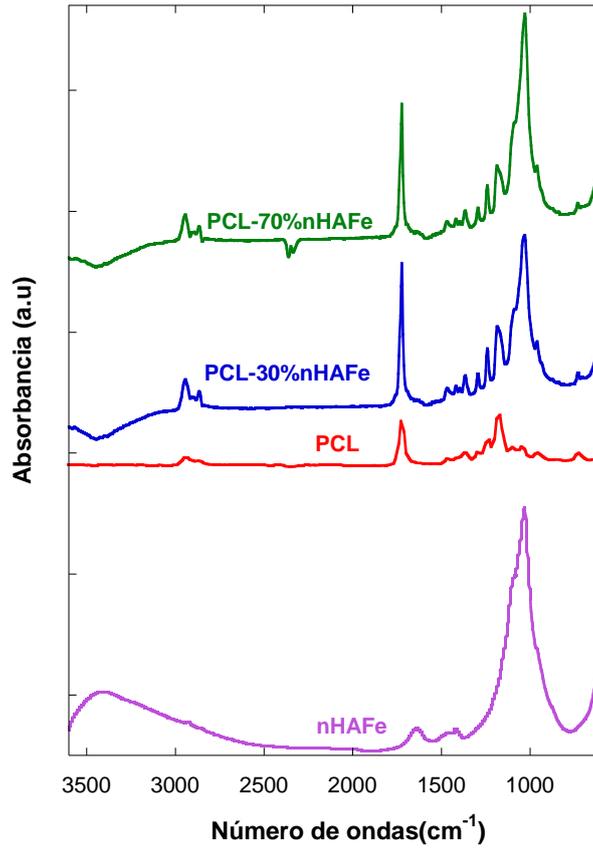


Figura 4.3.- Espectros (FTIR) de absorción de muestras de PCL, PCL-30%nHAFe, PCL-70%nHAFe y nHAFe.

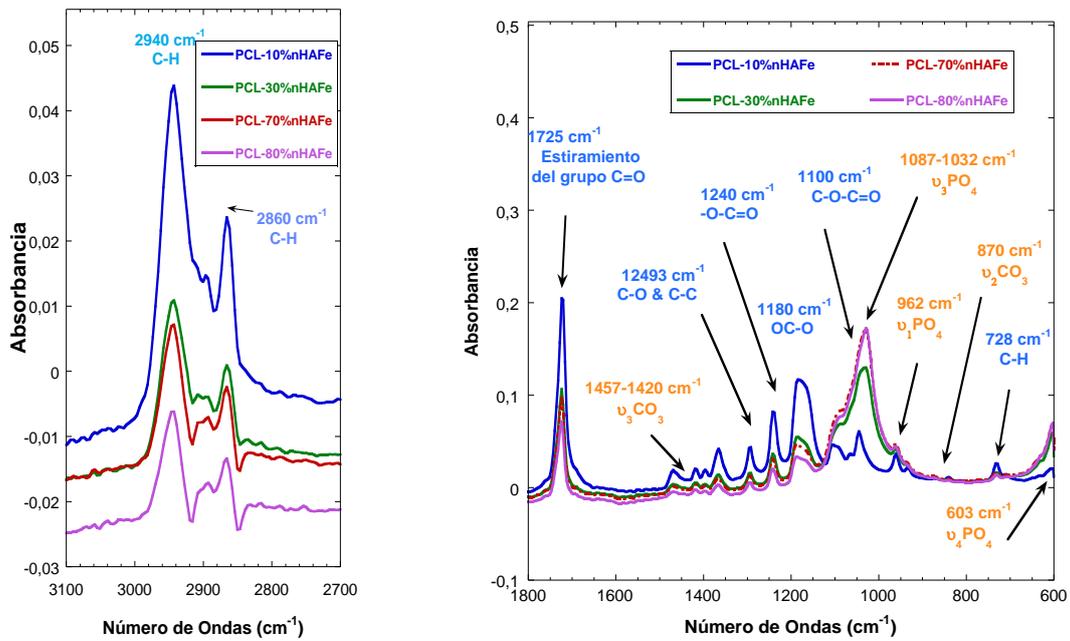


Figura 4.4.- FTIR-ATR serie PCL-nHAFe a la izda de 3100 a 2700 cm^{-1} y a la dcha. de 1800 a 600 cm^{-1} . Bandas de PCL (azul) y nHAFe (naranja).

En la Figura 4.3. los espectros IR de los andamios PCL-nHAF_e, no aparecen las bandas características de la región entre 3500 y 3000 cm⁻¹ correspondientes a los grupos OH⁻, mientras que en la nHA se ven claramente.

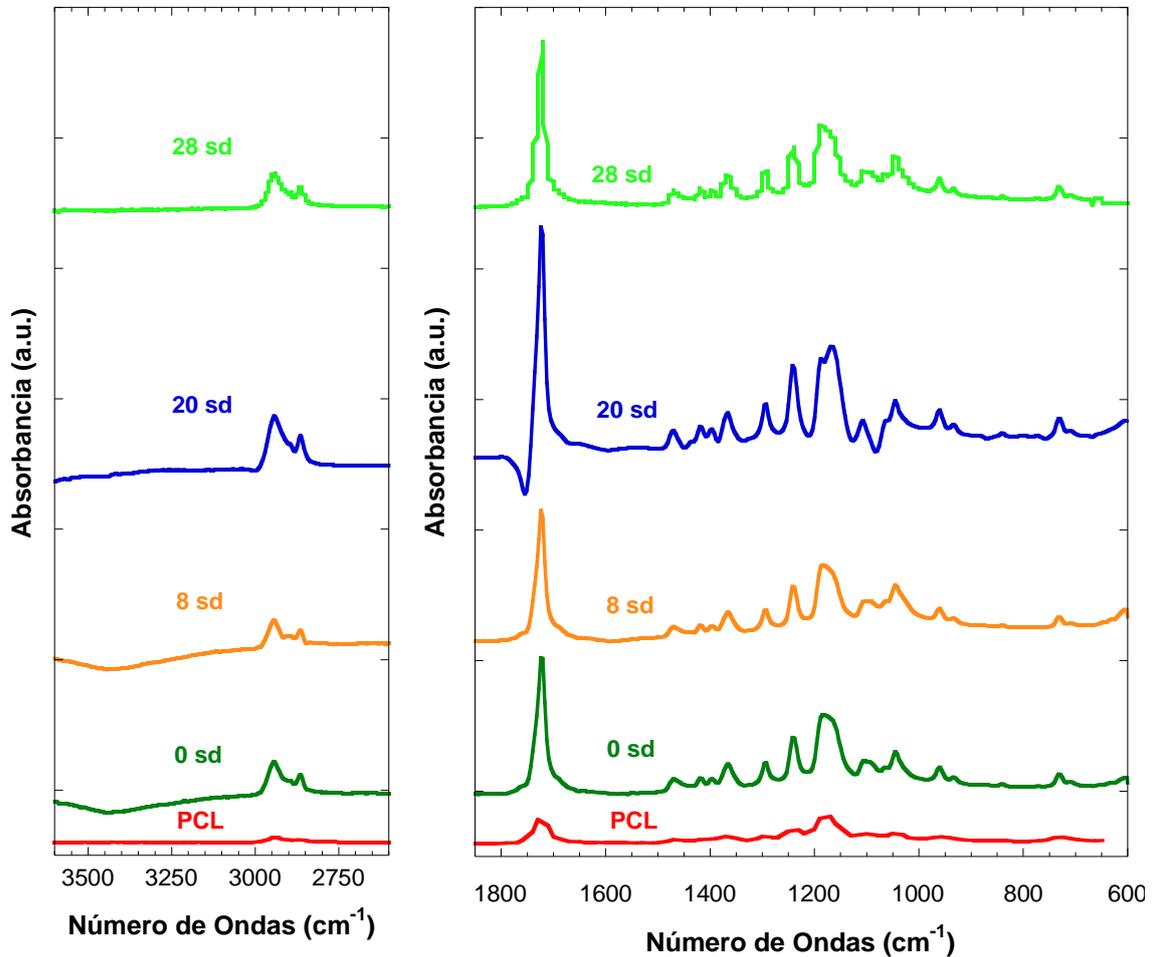


Figura 4.5- Espectro (FTIR) PCL, PCL-10% nHAF_e de 0, 8, 20 y 28 sd.

En la Figura 4.4 podemos observar como al disminuir la cantidad de polímero en la mezcla, disminuye la intensidad de todos los picos del polímero, exceptuando el modo de vibración del grupo -C-O-C=O asimétrico a 1100 cm⁻¹, que sufre el solapamiento con los modos de vibración ν_3 y ν_1 del grupo fosfato de la hidroxiapatita. En esta misma situación aumentan su intensidad las bandas características de los modos de vibración ν_3 , ν_1 y ν_4 de los grupos fosfato, pero no este aumento no se aprecia en las bandas de vibración de los grupos carbonatos.

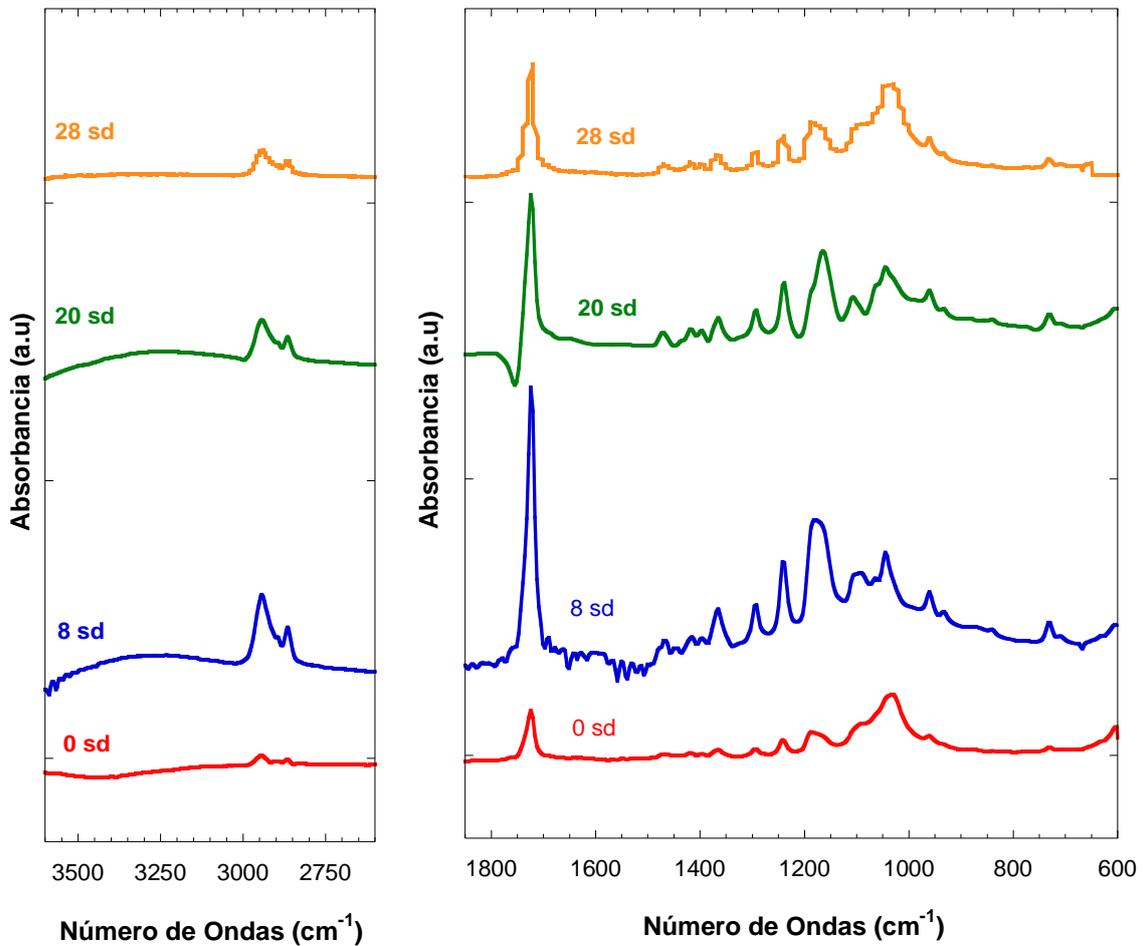


Figura 4.6- Espectro (FTIR) PCL-30% nHAF_e de 0, 8, 20 y 28 sd

Otros investigadores han estudiado mediante esta técnica la degradación de este polímero y han fijado su estudio de degradación en tres bandas, que se ven afectadas si se produce la escisión del enlace ester, produciendo un grupo carbonilo y un grupo alcohol [137, 138].

- En primer lugar, estudiar las posibles variaciones en las longitudes de onda 630 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} por si aparecen las bandas representativas de los grupos hidroxilo (OH-) [139-141].
- Una segunda zona de observación fue la región entre 1100 y 1050 cm^{-1} , donde nos fijaremos en si se produce un aumento de intensidad en estas bandas, si este doblete aumenta su intensidad de bandas, indicará que se está produciendo una transformación atribuible al enlace C-O

- Hacer un seguimiento de la variación de una banda característica de la PCL, en la zona de 1600-1800 (cm^{-1}) asociada al grupo carbonilo C=O del grupo éster (1725-1735 cm^{-1}) o del grupo ácido (1600 cm^{-1}).
- Una última zona de observación fue la región entre 1100 y 1050 cm^{-1} , en donde veremos si se produce un aumento de intensidad en estas bandas, si este doblete aumenta su intensidad, indicará que se está produciendo una transformación atribuible al enlace C-O

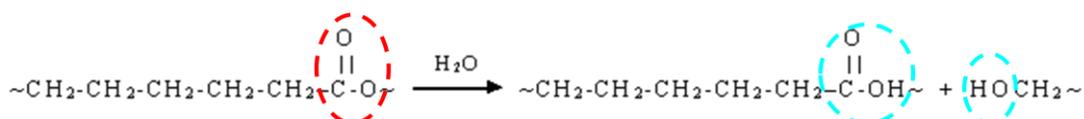


Figura 4.7.- Esquema de la degradación de la PCL

En las Figuras 4.5, 4.6 y 4.8 podemos observar las diferentes bandas de absorción y su evolución con el tiempo de degradación. La curva de color roja representa el espectro original de la PCL puro sin degradar.

Cabe destacar la aparición de bandas invertidas en algunos de los espectros de compuestos PCL-nHAFé degradados; esta forma anómala de la banda IR se ha observado anteriormente con moléculas orgánicas dispersas en discos KBr [142-144]. Este efecto, conocido como el "efecto Christiansen" se atribuyó a la diferencia entre el índice de refracción de las moléculas orgánicas y el KBr [142-144]. En nuestro caso al utilizar ATR no preparamos pastillas de KBr con nuestras muestras, sino que realizamos la medida directamente sobre el andamio, pero como los andamios tienen una alta concentración de poros de muy pequeño tamaño que están probablemente llenos de aire, debido a la diferencia entre el índice de refracción del aire atrapado en los poros y el composite poroso se puede explicar la presencia de los picos de absorción invertidos.

Esta banda invertida, no ha sido observada en los espectros FTIR sin degradar, únicamente la hemos observado en la semana 20 de degradación para las composiciones de PCL-10% nHAFé y de PCL-30%nHAFé y en la semana 25 de la composición PCL-80%nHAFé.

Durante el proceso de degradación no aparece una banda de absorción que se pueda corresponder con el estiramiento de los grupos terminales carboxilo C=O a 1700 cm^{-1} para las distintas composiciones de PCL-nHAFe; que sería una señal de la hidrólisis de las cadenas [113]. Únicamente en la composición PCL-70%nHAFe en la semana 28 de degradación se observa un pequeño hombro en esta zona (Figura 4.8).

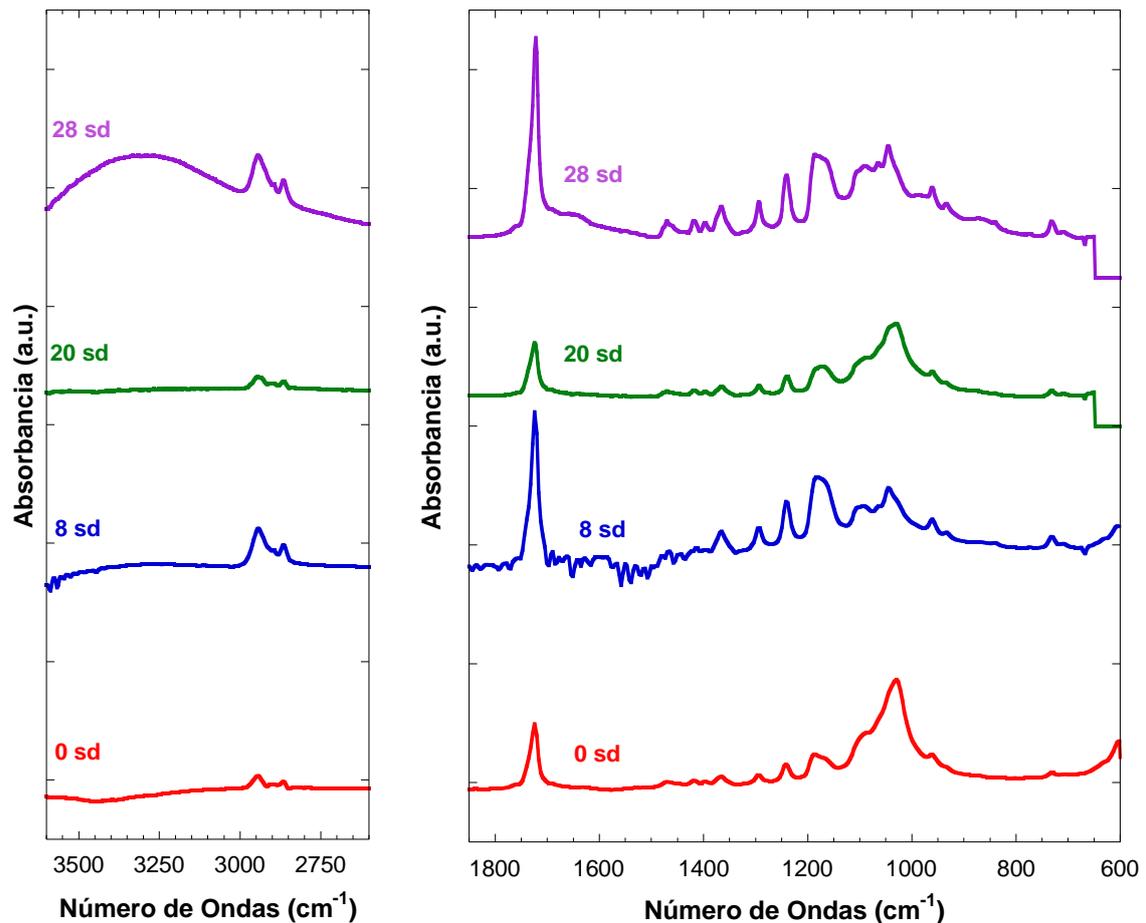


Figura 4.8- Espectro (FTIR) PCL-70%nHAFe de 0, 8, 20 y 28 sd.

Próximo a las longitudes de onda 630 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} no aparecen las bandas representativas de los grupos hidroxilo (OH-)[35-37].

Para la investigación de los grupos carboxilo y carbonilo, durante el tiempo de degradación, los picos C-O y C = O en las semanas que no son la semana 0 parecían ser aleatoriamente más altos o más bajos que los picos en la semana 0, lo cual era inusual y difícil de explicar, resultados que coinciden con los

obtenidos por otros investigadores [145]. La razón de esto es la utilización del ATR, cuando no se ajusta la muestra al cristal con la misma intensidad se produce una variación en la intensidad de absorción de todo el espectro.

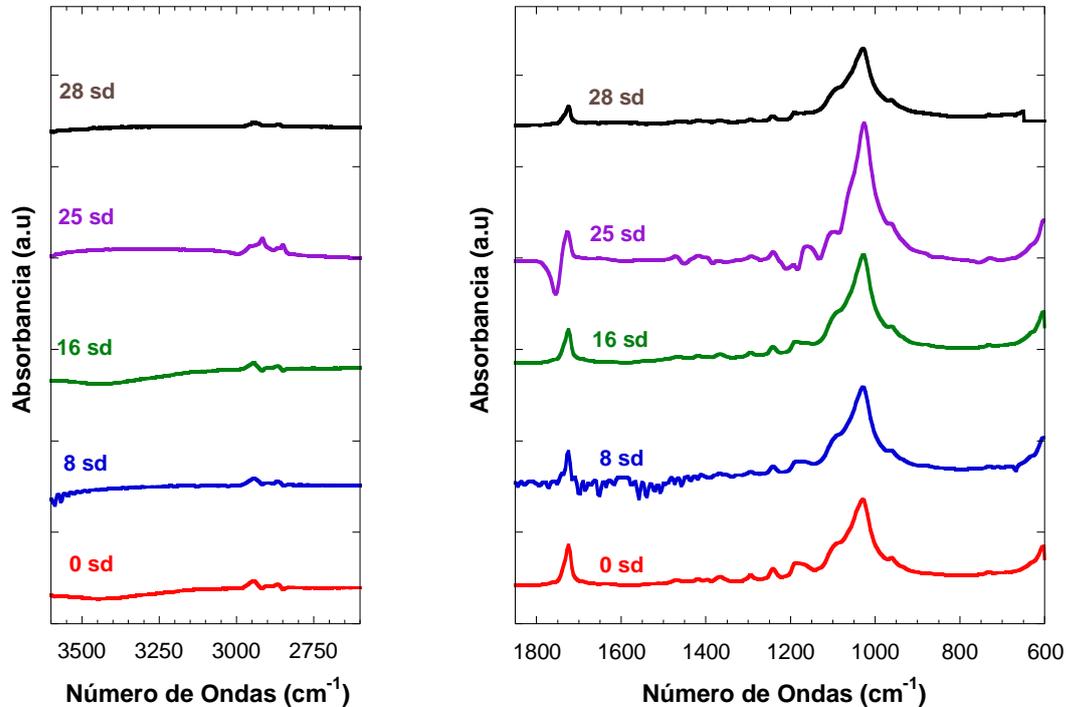


Figura 4.9.-Espectro (FTIR) PCL80%*n*HAF_e de 0, 8, 16 y 25 sd.

4.1.3.- Análisis Térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En este estudio hemos realizado un análisis de las propiedades térmicas del material en función del tiempo de degradación, con la finalidad de comprender como las características y propiedades del sistema están siendo afectadas por el proceso de degradación hidrolítica.

Las transiciones térmicas de los soportes porosos fueron analizadas sometiendo las muestras a 3 barridos:

- 1^{er}.Barrido: calentamiento, obtenemos información del estado actual. Evaluando la temperatura de fusión T_m y la entalpía ΔH_m .
- 2^o Barrido: enfriamiento. Obtenemos la temperatura de transición vítrea T_g , la cual es indicativa de los movimientos de los segmentos de las cadenas poliméricas. También obtenemos la entalpía de cristalización y

la temperatura de cristalización, ya que el PCL es un polímero semicristalino, ΔH_c , la temperatura de cristalización T_c , etc.

- 3^{er} Barrido: calentamiento es igual que el primero y se utiliza para estudiar el estado de equilibrio de las muestras una vez eliminada su historia térmica.

Los resultados obtenidos para este sistema se recogen en las Tablas 4.1-4.3.

Tabla 4.1.-Parámetros térmicos en función del tiempo de degradación de las muestras del Sistema PCL-nHAFe:

Muestra PCL tdeg(sem)	1 ^{er} Barrido		2 ^o Barrido		3 ^{er} Barrido		Xc % ^a	CF% ^b
	Tm ₁ (°C)	ΔHm ₁ (J/g)	Tc(°C)	ΔHc (J/g)	Tm ₂ (°C)	ΔHm ₂ (J/g)		
0%nHAFe	60.2	107.4	25.6	64.7	57.0	83.2	77	60
10%nHAFe	59.8	92.4	26.2	54.7	58.8	65.2	66	59
0sd								
5sd	63.5	94	28.2	55.3	56.2	65.6	67	59
8sd	64.8	103	27.7	60.9	57.6	66.8	74	59
10sd	63.3	108	27.7	64.3	55.4	68.5	77	59.5
16sd	57.2	81.2	26.6	60.5	56.6	68.1	58	74.5
20sd	63.7	94	23.4	57.5	55.5	70	67	61
25sd	68.8	98.5	28.8	57.8	55.7	70.5	70.5	59
28sd	63.8	100	27.8	59.8	55.7	71.5	72	60
20%nHAFe	59.9	85	28.3	51.3	56.9	65.9	61	60
0sd								
30%nHAFe	60.2	77	26.7	47.5	57.5	54.2	55	61.5
0sd								
5sd	62.6	81.6	28.8	50.3	55.4	56.8	58.5	61.5
10sd	63.5	82.6	27.6	51	57.4	57.3	59	61.5
16sd	62.8	83	27.5	49	57.9	57.8	59.5	61.5
20sd	63.3	82.5	28.2	48	57.4	55	59	58
25sd	62.6	78	28.1	45.9	56.8	54.2	56	59
28sd	65.7	76	29.4	44.7	56.5	53.6	54.5	59
70%HAFe0sd	56.9	32.6	29.5	17.8	54.7	23.9	23	54.5
5sd	61.1	35	29.9	19.6	54.8	26.7	25	54.5
10sd	60.5	25	30.5	14.2	54.8	17.6	18	56
16sd	60.9	27	30.5	13	54.9	19.6	19.5	48
20sd	61.2	45	29.7	27	54.6	31.2	32	60
28sd	66	37	30.8	13	55.6	19	26.5	35
80%HAFe	54.7	19.6	28.4	10.8	51.4	14	14	55
0sd								
5sd	58.1	20.1	29.4	11.1	52.1	14.4	14.5	55
10sd	58.7	21.9	29.7	12	53.1	15.7	16	55
16sd	60.5	23	29.5	6.4	52.7	11.2	16.5	28
20sd	58.2	19.6	23.5	10	52.4	10.9	14	51
25sd	60.3	21.2	29.6	13.2	52.9	18.3	15	62
28sd	61.3	19	21.8	13.3	52	17.6	13.5	70

Tabla 4.2.- Valores de T_g (°C) en los andamios en función de la cantidad de la cantidad de nHAFe.

%nHAFe	0	10	20	30	70	80
T_g (°C)	-58,9	-59,2	-60,1	-55,8	-55,4	-54,2

Muestras sin degradar

El análisis de DSC muestra que la adición de nanopartículas en los andamios ha modificado el polímero, habiendo producido un decrecimiento en la cristalinidad ($X_c\%$) de 77% en el andamios de polímero puro, a 66% en PCL-10%nHAFe, llegando hasta el 14% en el PCL-80%nHAFe, como se recoge en la Tabla 4.1.

Teniendo en cuenta las propiedades térmicas de los compuestos, debemos señalar la importancia de la T_g . Como se muestra en la Tabla 4.2, la T_g de las muestras con un 10% y con 20% de nHAFe disminuye con el aumento de la fracción de carga en comparación con el polímero puro. Un fenómeno similar ha sido observado por Razzaq et al. [146] y posteriormente por Gall et al. [147]. Se plantea la hipótesis de que la adición de grandes cantidades de partículas dificultan el proceso de cristalización del polímero y por ello disminuye la cristalinidad. La interfase partícula-matriz puede ayudar a aumentar la velocidad o el número de frentes de crecimiento de transición en la nanoescala, lo que resulta en una transición general más rápida [147]. Sin embargo para concentraciones mayores la transición vítrea aumenta, este incremento puede ser debido a que las nanopartículas incrementan la rigidez de las cadenas macromoleculares [148].

En el caso de las muestras sin degradar, es evidente que su temperatura de fusión no fue apenas alterada para las composiciones con un contenido de nanopartículas de 10, 20 y 30% con respecto al polímero puro tomando un valor $\sim 60^\circ\text{C}$, T_m ; por tanto su estructura cristalina no ha sido alterada con cantidades de nanopartículas hasta el 30%, como confirman los termogramas de DSC. Mientras que para las composiciones con un contenido de 70 y 80%, se produce una disminución apreciable hasta 57 y 55°C respectivamente; esto puede deberse a que la introducción de grandes cantidades de nHAFe en las

cadena de polímero las hace más rígidas y por lo tanto disminuyen su cristalinidad. Por otro lado el área bajo el pico de fusión, entalpía de fusión (ΔH_m), disminuye claramente con el aumento de la concentración de nHAFe, incluso para la composición con un contenido del 10% de nanopartículas que baja a 92,4 J/g siendo la entalpía de fusión del polímero puro de 107,4 J/g; y llega a disminuir hasta 19,6 J/g para la composición con un contenido de 80% nHAFe.

En resumen, las muestras con mayor contenido de partículas de nHAFe disponen de menor cristalinidad y entalpías de fusión. Esto es debido a que las nanopartículas añadidas aumentan la rigidez de las cadenas poliméricas, lo cual es observable tanto en el porcentaje de cristalinidad, como en la temperatura de transición vítrea. Además la adición de grandes cantidades de nanopartículas provoca su coalescencia y de ahí los cambios observados.

La cristalización de un polímero depende de la capacidad de sus cadenas para moverse y formar una estructura cristalina. La entalpía de cristalización (ΔH_c) es indicativa de la longitud de cadena del polímero. Solamente las regiones cristalinas del polímero tienen una temperatura de fusión.

Por otro lado, la temperatura de transición vítrea es característica de la fase amorfa y por tanto, es más importante en polímeros amorfos, dándose con tanta mayor intensidad cuanto menor es la cristalinidad del polímero, por tanto debido a la alta cristalinidad de la PCL inicial, la transición T_g se ha caracterizado por su baja intensidad.

Además, todos los termogramas de DSC revelaron dos picos característicos diferentes en todas las muestras con nanopartículas, es decir, un pico de fusión endotérmica a 54,7-59,8°C en el primer barrido y un pico de cristalización exotérmica a 26,2-29,5°C en el segundo barrido; como se puede observar en la Figura 4.10.

A este propósito, debe recordarse que la T_m depende de la longitud de los segmentos moleculares ordenados del cristal: los cristales gruesos pueden fundir a una mayor temperatura y los delgados a una menor. Los polímeros raramente cristalizan con tamaños de cristal del mismo espesor, variando a lo largo de todo el material. Con ello podemos asegurar que la temperatura T_M

viene definida por la correspondiente a los cristales más gruesos, mayores y más perfectos que se puedan obtener, de modo que la cristalización se produce en un sistema con muchas restricciones; el número de enlaces inter-cristalinos es alto y el porcentaje de regiones amorfas no cristalizables aumenta al aumentar la concentración de partículas. El *CF%* es similar para el PCL con 0, 10, 20 y 30% de nanopartículas (59-61.5%); mientras que para contenidos superiores disminuye hasta ~55%.

Muestras degradadas en PBS

El ensayo de DSC en este estudio se utilizó para determinar la temperatura de transición vítrea, T_g , y los cambios de la misma durante la degradación. De forma similar a la temperatura de fusión, T_m que depende del peso molecular del polímero y la T_g disminuyen debido a la reducción del peso molecular, durante la degradación, las cadenas largas de la molécula se rompen en cadenas más cortas dando como resultado la reducción del peso molecular [149].

Tabla 4.3 Valores de T_g (°C) en función de la cantidad de nHAFé y tiempo de degradación (semanas).

Muestra	T_g (°C)							
	PCL/%nHAFé	0sd	5sd	10sd	16sd	20sd	25sd	28sd
10%		-59,2	-59,4	-59,7	-64,2	-58,9	-62,5	-62,7
30%		-55,8	-57,9	-59,2	-59,5	-62,3	-62,3	-62,6
70%		-55,4	-57,2	-60,5	-58,5	-61,2		-62
80%		-54,2	-55,4	-56,1	-61,3	-62,6	-62,5	-63,2

Como se muestra en la Tabla 4.3, la T_g se desplazó a temperaturas más bajas cuando el tiempo de degradación aumentó. En este sentido, la temperatura de transición vítrea se desplazó en la semana 28 hasta un valor entorno a -62°C para todas las composiciones, siendo esta disminución mayor cuanto mayor es

la cantidad de nanopartículas, si tenemos en cuenta el valor inicial de cada composición.

El grado de cristalinidad aumenta al principio y luego disminuye después de las 20 semanas de degradación (Tabla 4.1). Este aumento durante la degradación ha sido discutido con frecuencia en la literatura [150], la mayoría de los autores sugieren que es producto de un reordenamiento de las cadenas más cortas generadas por el propio proceso de degradación, junto con la consiguiente formación de nuevos cristales. Li et al. [151] y Leenslangl et al. [152] explicaron este proceso por la hidrólisis de enlaces éster que ocurren en la región amorfa del polímero alifático, lo que explicaría el aumento observado en la cristalinidad. Estos autores postularon que la degradación se produce en dos etapas principales. En primer lugar, el agua se difunde en las regiones amorfas menos organizadas que penetra más fácilmente que las altamente ordenadas, regiones cristalinas densamente empaquetadas, para producir la degradación hidrolítica de las regiones amorfas y una reorganización de los extremos de cadena sueltos. En las condiciones semicristalinas la degradación de los polímeros comienza en la parte amorfa [153]; si esta parte sale del polímero, el grado de cristalinidad aumenta. Durante la degradación, la fracción cristalizable ($CF\%$) aumentó en todas las composiciones (salvo en la de 30% nHAF_e, que no aumentó a lo largo de las 28 semanas de degradación). El valor de $CF\%$ está en relación con la longitud de las cadenas poliméricas. Si la longitud de la cadena polimérica se reduce a un grado apropiado, las cadenas acortadas son capaces de cristalizar más fácilmente en el 2º Barrido y $CF\%$ aumenta. El mayor incremento en $CF\%$ se observó para las muestras degradadas de las composiciones de 10% y 80%, lo que indica que en estas composiciones las cadenas se han acortado más [139].

La segunda etapa comienza cuando la mayoría, si no todas, las regiones amorfas se han eliminado y el agua penetra lentamente en las regiones cristalinas. Si se deja que la hidrólisis continúe, disminuye la cristalinidad a medida que las partes cristalinas son también afectadas.

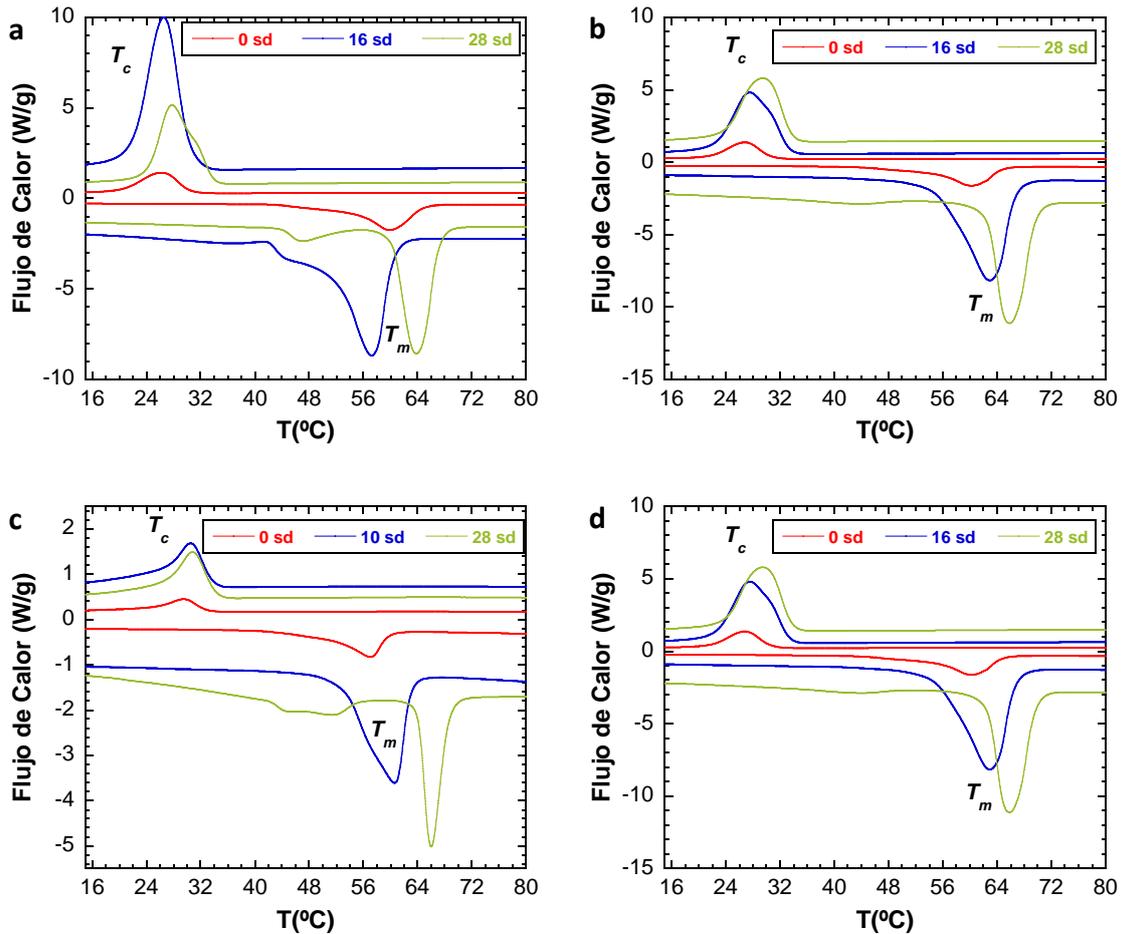


Figura 4.10.- Termograma (a) PCL-10%nHAFc 0, 16 y 28 sd, (b) PCL-30%nHAFc 0, 16 y 28 sd, (c) PCL-70%nHAFc 0, 10 y 28 sd y (d) PCL-80%nHAFc 0, 16 y 28 sd

También se observó que el punto de fusión se incrementó (ligeramente) debido a la degradación de las muestras, y se apreció un ensanchamiento del intervalo de temperatura de fusión. Todos los andamios fabricados independientemente de la composición presentan en los termogramas durante el primer calentamiento dos picos (28 semanas de degradación), lo que podría atribuirse a la presencia de dos tamaños de cristales diferentes como ya hemos explicado anteriormente (ver Figura 4.10). También se observa este doble pico en la composición con un 10% de partículas en la semana 16 de degradación. Este efecto podría atribuirse a una disminución del peso molecular, como consecuencia de la hidrólisis del grupo éster. Como resultado, la formación de pequeños dominios con un grado muy bajo de perfección tuvo lugar en las muestras y se observó la fusión parcial de los cristales defectuosos.

4.1.4.- Propiedades Magnéticas (VSM)

Mediante el magnetómetro de muestra vibrante se realizó la caracterización magnética de los andamios de PCL-nHA-Fe y nHAFe a 37°C (temperatura fisiológica). Se trata de conocer su respuesta magnética (M), su imanación de saturación (M_S), el valor de su campo coercitivo (H_C) a la temperatura en que trabajarían luego.

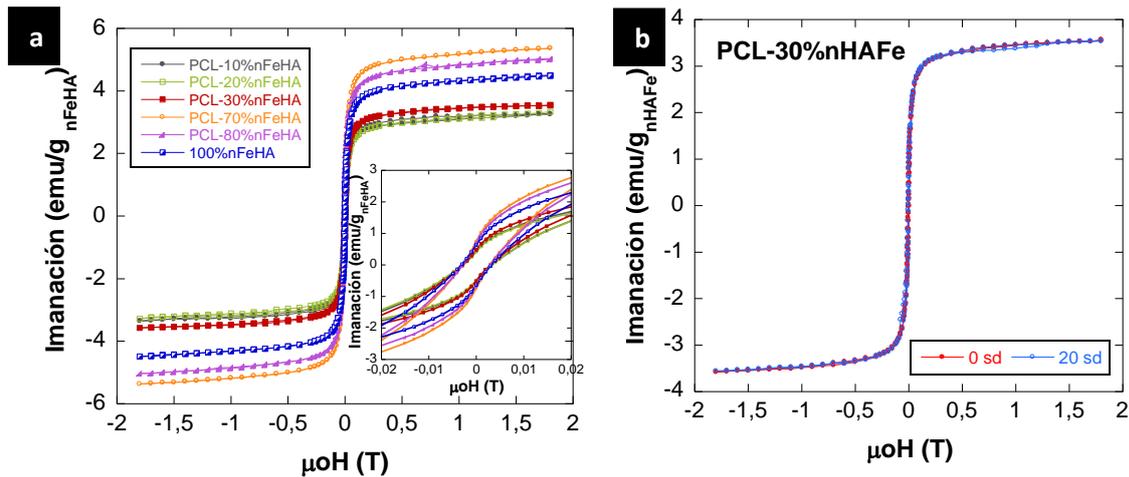


Figura 4.11.- (a) Curvas de imanación obtenidas para nHAFe y de los andamios de PCL-nHAFe, detalle ciclo de histéresis “wasp-waisting” ampliado (b) Curva $M(H)$ PCL-30%nHAFe sin degradar y 20 semanas de degradación.

La Figura 4.11 (a) representa las curvas de imanación de todas las muestras normalizadas al contenido nominal de nHAFe. La forma de las curvas es casi idéntica, lo que sugiere un cambio insignificante de la interacción entre las nanopartículas de Fe con la dilución de la nHAFe en PCL. Una visión más cercana, sin embargo, revela una ligera pero constante disminución de la coercitividad a medida que avanzaba la dilución. Los valores tanto de la imanación de saturación a 1,5 T como del campo coercitivo aparecen en la Tabla 4.4. El campo coercitivo muestra una disminución de casi 10% como consecuencia de la dilución. En el compuesto puro, el valor del campo coercitivo, ≈ 3 mT (≈ 30 G), era bajo, pero no lo suficientemente bajo como para surgir del comportamiento superparamagnético (SPM) puro, no interactivo de las partículas de Fe. Mientras que el tamaño de las partículas puede justificar el magnetismo de SP en partículas aisladas, la interacción entre

partículas da lugar al comportamiento ferromagnético, lo que se confirma por la rápida saturación de las curvas. En vista de estas consideraciones, y del comportamiento no monótono de las curvas de imanación, observada en la Figura 4.11, se utilizó la imanación de saturación para recalcular el contenido de nHAFe de las muestras (Tabla 4.4).

Tabla 4.4.- Imanación, coercitividad, y contenido de nHAFe recalculado a partir de las medidas magnéticas

% nHAFe Nominal	Imanación (Am²/kg_{nHAFe})	μ₀ H_c (mT)	%nHAFe recalculada
100 ⁽¹⁾	4.45	3.18	—
10	3.22	3.11	7.2
20	3.27	3.08	14.8
30	3.60	2.92	24.3
70	5.31	2.92	83.3
80	4.96	2.89	88.9

⁽¹⁾nHAFe pura tomada como referencia.

La forma de la curva de histéresis también puede indicar si está presente más de una sustancia magnética. Por ejemplo, si el material contiene dos fases magnéticas, una con campo coercitivo alto y otra bajo, el ciclo de histéresis será menor en el origen; estos ciclos se denominan cintura de avispa [97].

Los ciclos de histéresis Figura 4.11 (a), presentaron forma de “cintura de avispa”, como era de esperar tras la caracterización de las nanopartículas sintetizadas en el apartado anterior; lo que indica la presencia de fases ferrimagnéticas de diferentes coercitividades o combinación de granos monodominio y granos superparamagnéticos.

La disminución del campo coercitivo con la dilución sugiere una ligera disminución de la interacción entre las nanopartículas de Fe a medida que aumenta su separación. Este comportamiento monótono también confirma una buena dispersión del Fe en la nHA en todas las etapas. De lo contrario, las

fluctuaciones de la distancia media entre las partículas deberían reflejar grandes fluctuaciones en la coercitividad.

En la Figura 4.11 (b) se observan las curvas de histéresis de la composición PCL-nHAFe sin degradar y trascurridas 20 semanas de degradación, superponiéndose ambas curvas. Los parámetros magnéticos, incluyendo la imanación de saturación (M_s) y el campo coercitivo (H_c) en todas las composiciones son muy similares tras 20 semanas de degradación a los parámetros magnéticos de las muestras sin degradar.

4.1.5.- Absorción de agua

Al entrar en contacto un material con un medio acuoso, el agua penetra en la matriz polimérica y provoca hinchamiento. La degradación hidrolítica sucede en cuatro etapas:

- 1ª Absorción y difusión de agua,
- 2ª Los grupos ácidos del final de las cadenas autocatalizan la reacción de hidrólisis.
- 3ª Se alcanza un peso molecular crítico y los monómeros comienzan a salir fuera del bloque polimérico. Las moléculas de agua se difunden en el vacío creado por la eliminación de los monómeros, lo cual a su vez estimula el proceso de difusión de éstos. Se produce una gran disminución de la masa polimérica y un fuerte aumento de la liberación de principios bioactivos, en nuestro caso sería de nHAFe, que se difunden a través de los poros.
- 4ª La matriz polimérica aumenta mucho su porosidad y la degradación avanza de forma homogénea y mucho más lentamente [26, 154].

La inclusión de nHAFe modifica la condición hidrofóbica del polímero y favorece la entrada de PBS [155]. De este modo las muestras con 70% y 80% de nHAFe absorbieron más PBS que el resto. Este comportamiento ha sido observado en otros estudios de degradación [156]. En nuestro caso, la nanopartículas de nHAFe provocan una gran absorción de agua, a pesar de lo cual, no se produce en las muestras una degradación más rápida sino todo lo contrario.

La Figura 4.12 (a) muestra que todos los andamios absorbieron una gran cantidad de agua en las primeras 5 semanas de incubación. Sin embargo, después de 5 semanas, la absorción de agua osciló ligeramente hasta la semana 16 en todas las composiciones. A partir de esta semana, siguieron una tendencia diferente:

- las composiciones de 10% y 30% aumentan la absorción alcanzando su máximo en la semana 25.
- las composiciones de 70% y 80% mostraron un decaimiento en la absorción con el paso del tiempo de degradación.

En la Figura 4.12 (a), podemos ver el % de absorción de agua en función del tiempo de degradación. Un sistema complejo que consiste en una matriz de PCL hidrófoba y nanopartículas de HAFe hidrófilas tiene una mayor probabilidad de absorber un medio acuoso que el polímero puro. Esta mayor tendencia a la absorción de agua podría facilitar la infiltración del medio de degradación en el interior del compuesto; pero de menor efectividad, ya que los monómeros producto de la degradación tienen menor volumen para su difusión en el interior del andamios con nHAFe, limitando la salida de los monómeros por los poros, que son más pequeños al adicionar la nHAFe, disminuyendo su velocidad de degradación. La adición de estas nanopartículas hace disminuir el tamaño de poro, como se vió al estudiar la morfología de los andamios [157].

Si comparamos estos resultados con los del sistema PCL-nHA en trabajos previos [118], podemos ver que la introducción de cationes Fe en nHA aumenta las tasas de absorción de agua de los andamios. Sin embargo, la introducción de mayores volúmenes de agua, no implica ningún aumento en la velocidad de degradación, debido al carácter hidrofílico tanto de las nanopartículas de nHAFe como de las de Fe_3O_4 que fueron capaces de absorber las moléculas de agua que penetran dentro de la matriz polimérica ralentizando la descomposición hidrolítica de las cadenas de PCL. Por otro lado el carácter alcalino tanto de la nanohidroxiapatita como de la magnetita, pueden haber neutralizado los productos ácidos consecuencia de la degradación, lo que eliminó el efecto de degradación autocatalítica del polímero [158-160].

Los andamios de PCL-nHAFe absorbieron una gran captación de agua sin por ello aumentar la degradación *in vitro*. La presencia de las nanopartículas de

HAFé aumentó la hidrofiliidad del polímero sin disminuir el pH del entorno local. EL aumento de la captación de agua puede también haber permitido que los productos ácidos resultantes de la degradación abandonen más fácilmente el interior del andamios [24].

4.1.6.- Variación del pH

Se determinó la variación en el *pH* del medio acuoso con el tiempo de degradación, para verificar la liberación de residuos ácidos de las muestras de PCL. Esta determinación también proporcionó información de la producción de ácido total, que refleja el avance del proceso de degradación.

El pH de la solución tampón permaneció prácticamente invariable (7.22- 7.12) a lo largo de las 28 semanas de degradación *in vitro* en todas las muestras [160]. La liberación de productos de degradación ácida del polímero provoca una disminución en el pH del medio donde se realiza la degradación, en nuestro caso PBS con un pH inicial de 7.2 [24, 161].

La Figura 4.12 (b) muestra las medidas de *pH* de los andamios PCL y PCL / nHAFé en función del tiempo de degradación *in vitro*. En todas las muestras estudiadas, puede observarse una muy pequeña pero sostenida disminución del pH de aproximadamente 7,2 a 7,1, excepto en el andamio PCL-10% nHAFé, en el que se observó un aumento del pH durante las dos primeras semanas de degradación, para posteriormente caer ligeramente. El descenso en el pH es mínimo, menor de un 0.1%, debido al carácter básico de las nanopartículas o porque realmente el producto de degradación es mínimo. En estudios sobre la degradación *in vitro* de compuestos de PCL / magnetita, otros autores han encontrado que la magnetita aumenta el valor del pH del medio PBS [26]. Los valores parecen no ser significativos en un proceso de degradación *in vitro*.

Por otro lado, también es importante para la estabilización del pH en el rango fisiológico la existencia de suficiente material cerámico capaz de neutralizar los productos de degradación del polímero y liberados al medio de degradación, gracias al carácter alcalino de las nanopartículas añadidas al PCL [159].

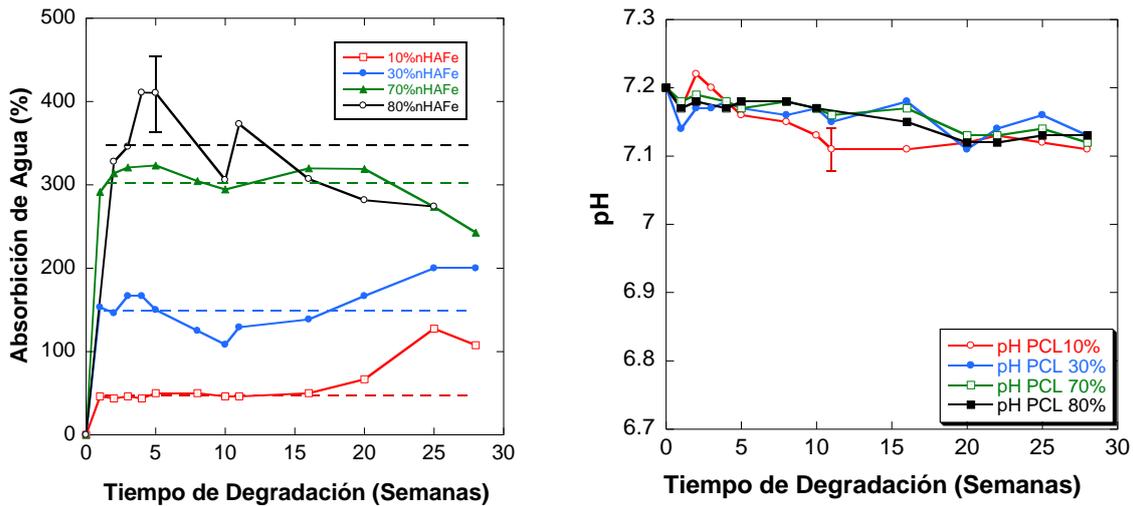


Figura 4.12.- (a) Absorción de agua, por los andamios de PCL y PCL-nHAFe, en función del tiempo de degradación (b) Variación del pH de la solución tampón fosfato frente al tiempo de degradación

4.1.7.- Pérdida de masa y peso molecular

Al entrar en contacto un material con un medio acuoso, el agua penetra en la matriz polimérica y provoca hinchamiento, ruptura de puentes de hidrógeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y finalmente la hidrólisis de los enlaces inestables. El concepto degradación de polímeros se asocia a una disminución del peso molecular, por lo que es necesario que la cadena principal se rompa por varios puntos.

La pérdida de masa, calculada con la Ec. 2.2, mostrada en el apartado 2.6, indicó que no hubo una variación en el peso de todas las muestras durante el periodo de degradación de 28 semanas bajo estudio. Estos resultados no están de acuerdo con los resultados de los estudios de degradación de otros investigadores, que tampoco mostraron pérdida apreciable hasta ocho o nueve semanas después de la degradación.

La variación en el pH suele ir acompañado de una disminución del peso del polímero, y en nuestro sistema no se aprecian variaciones en ninguno de estos dos parámetros. [162].

Tabla 4.5.- M_w , M_n e I del Sistema PCL-nHAFe.

Muestra	Tiempo de degradación			
	(semanas)	M_w	M_n	I
PCL	0	134418	92103	1.459
PCL-10%nHAFe	20	152188	105149	1.447
	28	147702	106858	1.383
PCL-30%nHAFe	0	100162	137942	1.377
	20	159645	110581	1.443
	28	154781	109258	1.416
PCL-70%nHAFe	0	146439	98035	1.494
	20	156953	115723	1.356
	28	156865	114036	1.375

La GPC es la técnica estándar para la caracterización de polímeros en ensayos de degradación para determinar la reducción del peso molecular del polímero. Esta técnica nos permite establecer los valores de M_w , M_n e I , que están directamente relacionados con la longitud de las cadenas de polímero y la dispersidad de su peso molecular [118]. En la Tabla 4.5, podemos ver como el peso molecular promedio en peso (M_w), el peso molecular promedio en número (M_n) y la polidispersidad (I) no experimentan cambios significativos en sus valores.

La introducción de nanopartículas de HAFe retrasó el inicio del proceso de degradación, lo que es evidente por la ausencia de cualquier variación tanto en la masa molecular como en el peso molecular.

4.2.- SISTEMA PCL-nFe₃O₄. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN *IN VITRO*.

En este capítulo vamos a presentar los resultados obtenidos en la degradación in vitro de los andamios fabricados con PCL incorporando partículas magnéticas de nFe₃O₄, en proporciones 5 y 10 % del total de la masa del polímero. Por otro lado, para ver más claramente el efecto de las

nanopartículas, fabricamos andamios con 15 y 20 % de nanopartículas magnéticas.

Se observa que muchos factores influyen en el perfil de degradación de los andamios poliméricos, estos pueden ser desde las propiedades del polímero hasta la presencia de nanopartículas bioactivas. Las partículas pueden crear barreras físicas entre el polímero y el tampón o alterar el pH del medio con sus propios subproductos de degradación.

El protocolo de degradación *in vitro* se realizó en PBS a 37 °C durante 25 semanas y fue el mismo que el seguido para el PCL-nHAF_e. A priori este sistema debería presentar una degradación muy similar al estudiado en el apartado 4.1, al tratarse del mismo polímero. La policaprolactona puede tardar en degradarse dos o más años para pesos moleculares muy altos [163]. Para ver el efecto, a largo tiempo de degradación dejamos una muestra 24 meses degradando.

En este apartado estudiaremos como afectan las nanopartículas en el proceso de degradación de los andamios. Las muestras de PCL-nFe₃O₄ se hincharon mucho menos, que las muestras de PCL-nHAF_e estudiadas en el apartado 4.1, durante las 5 primeras semanas, incluso varias semanas después de comenzar la degradación, aunque hacia la semana 12 sí que era evidente una absorción notable de agua.

Otros autores [127, 164-167], han desarrollado un procedimiento sintético para obtener andamios de PCL-nFe₃O₄, pero, no han estudiado en profundidad la degradación *in vitro* de estos compuestos.

4.2.1.-Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica TIPS con bajos porcentajes de polímero frente a volumen de disolvente, crea andamios altamente porosos con una estructura aleatoria de poros como puede verse en las imágenes SEM figura 4.12. Se obtuvo una estructura de nucleación típica en todos los andamios debido a que la velocidad de enfriamiento era demasiado rápida para que se produjera la separación de fases [168]. La obtención de andamios con las nanopartículas

homogéneamente distribuidas con el PCL, requería que el liofilizador permaneciera a -60°C durante 2 horas antes de introducir las muestras, de lo contrario se depositaban las partículas en el fondo del molde.

En primer lugar, analizaremos los cambios en la morfología de los andamios en función de la cantidad de magnetita añadida y posteriormente realizaremos el estudio de la degradación *in vitro* durante 25 semanas.

El efecto, al aumentar el contenido de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ en la composición del andamio, puede verse claramente en la Figura 4.12 (a) y (d) producen mayor tamaño de poro y paredes de poro más delgadas; adquiriendo un aspecto más disperso y distribución de poros más irregular. Por otro lado, comprobamos que las nanopartículas están uniformemente distribuidas. Presentan paredes de poro sólidas con partículas fuertemente unidas y recubiertas por el polímero, como también observábamos con las de $n\text{HAFe}$.

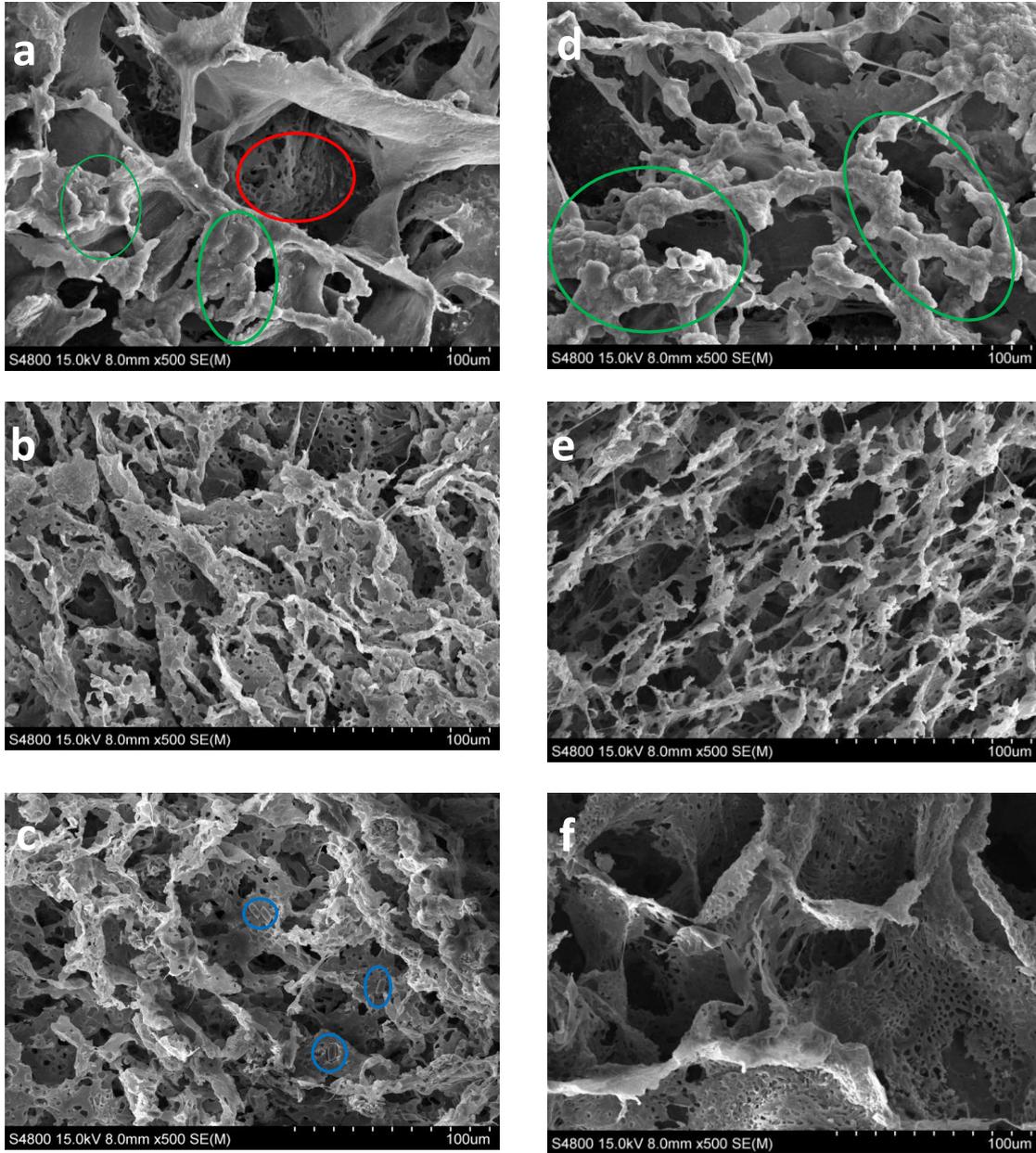
Medir los tamaños exactos de los poros no es sencillo debido a la anisotropía de la porosidad, pero en general los macroporos parecen tener $\sim 100\ \mu\text{m}$ de diámetro de media para la composición con un 5% de nanomagnetita frente a $\sim 130\ \mu\text{m}$ para la del 10%.

El diámetro de macroporo osciló entre $210\text{-}25\ \mu\text{m}$, y el diámetro de microporo, entre $2\text{-}10\ \mu\text{m}$, para la composición con un 5% de magnetita y entre $250\text{-}45\ \mu\text{m}$, y entre $4\text{-}15\ \mu\text{m}$ respectivamente para $\text{PCL}\text{-}10\%\text{nFe}_3\text{O}_4$.

Ambas composiciones presentaban rasgos topográficos típicos del mecanismo de nucleación y crecimiento, perceptibles a grandes aumentos (Figura 4.12 (a) y (d)). La superficie de las paredes de los poros contiene estructuras de tipo colina, con pequeños picos que dan a las paredes un aspecto de micro-nano rugosidad (señalado con círculos verdes) [169].

Por otro lado, conforme avanza el proceso degradativo los poros se hacen más pequeños y alargados (Figura 4.12 (b) y (e)); apareciendo una mayor microporosidad en ambas composiciones. En la composición $\text{PCL}\text{-}5\%\text{nFe}_3\text{O}_4$ se aprecia como empiezan a aparecer microporos de forma generalizada en las paredes del esqueleto del andamios en la semana 8 de degradación (Figura 4.12 (b)) mientras que en la del $10\%\text{nFe}_3\text{O}_4$ son apreciables a partir de la semana 16 (Figura 4.12(e)). Los poros no presentan paredes limpias y suaves

sino rugosas características de la separación líquido-líquido mediante el mecanismo de nucleación y crecimiento.



*Figura 4.12.-Micrografía SEM de PCL-5% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (a) 0sd, (b) 8sd, (c) 25sd y; PCL-10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (d) 0sd, (e) 16sd, (f) 25sd. **Círculos rojos** señalando microporos, **círculos azules** nanopartículas y **círculos verdes** microrugosidades.*

Las partículas de magnetita (**círculos azules**) son visibles a mayores aumentos tras el proceso de degradación de 25 semanas, pueden verse claramente en la Figura 4.12 (f) para la composición con menor cantidad de partículas.

Tras observar las Figuras 4.12 (c) y (e) se aprecia como en la semana 25 de degradación se ven más fibras rotas y poros ligeramente deteriorados. No observándose productos de degradación, si podemos observar alguna partícula de magnetita. Podemos concluir, que no había evidencia morfológica de la degradación de los andamios, a excepción del estiramiento de poro más pequeño que si hemos observado.

4.2.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopia Infrarroja, FTIR

La caracterización mediante FTIR de los soportes porosos compuestos PCL- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, indicó que no se había producido ninguna interacción entre ambos materiales, por lo que las nanopartículas magnéticas se encuentran homogéneamente dispersas por la estructura del andamio.

Esta técnica nos permite caracterizar las muestras sometidas a degradación y sin degradar, observando las diferencias y coincidencias entre los espectros infrarrojos obtenidos.

Las bandas características de la PCL se describieron en el apartado anterior (Figura 4.2). A continuación se recoge el espectro de las nanopartículas $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ en la Figura 4.13 (a).

Las bandas de PCL son evidentes en los espectros PCL- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, mientras que las bandas de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ tienen menor intensidad (Figura 4.13 (b)). Estos resultados confirman que es un material compuesto que consiste en nanopartículas de magnetita atrapadas en una matriz de PCL. Como los resultados indican, el enlace de carbono-oxígeno que se extiende en la región de $700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ es del componente PCL. Las bandas de vibración típicas de carbonilo, C=O y estiramiento de C-O a 1725 cm^{-1} y 1293 cm^{-1} respectivamente; así como los modos simétrico y asimétrico de CH_2 , a 2923 cm^{-1} y 2940 cm^{-1} , son también del polímero.

En la Figura 4.13 (b) podemos observar que las bandas de absorción no varían de posición, lo cual nos indica que no existe interacción de las partículas de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ con la PCL y que están uniformemente distribuidas, lo cual concuerda con los resultados experimentales mostrados por el SEM.

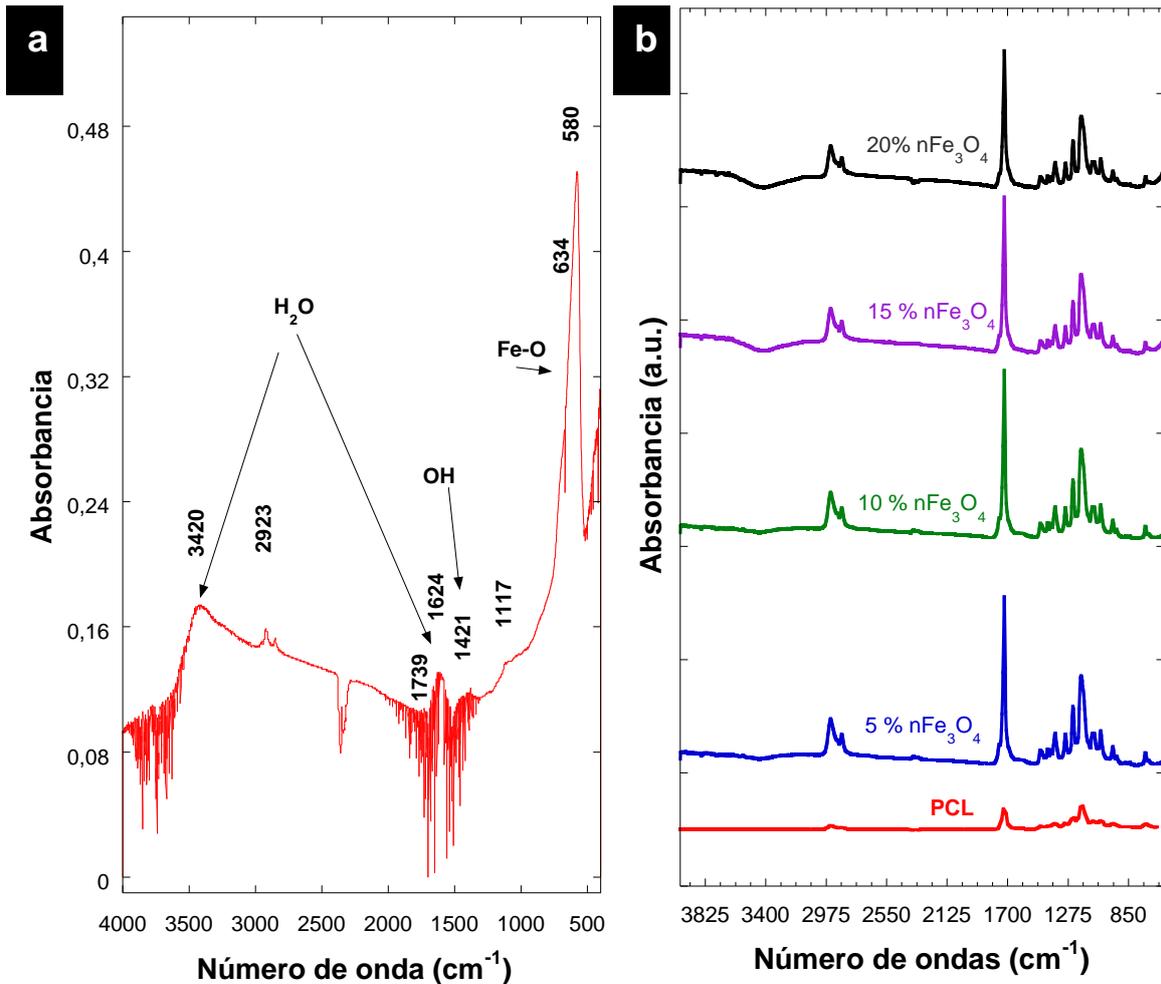


Figura 4.13.- Espectro (FTIR) de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (a) y $\text{PCL-nFe}_3\text{O}_4$ (b)

Al aumentar la cantidad de magnetita se observa como la banda situada sobre 3420 cm^{-1} del H_2O se hace cada vez más pronunciada, la banda de vibración característica del enlace Fe-O que apenas se percibe en las composiciones del 5% y 10% de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ se volvió más nítida en los andamios $\text{PCL-nFe}_3\text{O}_4$ con un mayor contenido en magnetita (Figura 4.13 (b)).

El carácter hidrofílico del sistema, se ve reflejado en la aparición de bandas anchas correspondientes a los grupos hidroxilos centradas en 3420 cm^{-1} (Figura 4.13 (b)) para todas las composiciones. Estas bandas indican la presencia de agua en el sistema pese al proceso de liofilización efectuado.

En la Figura 4.14 (a) y (b) no se aprecian signos apreciables de degradación, debido a la existencia de la banda ancha correspondiente a los grupos

hidroxilos centrada en 3420 cm^{-1} que podría enmascarar la aparición de una banda entre 2800 y 3600 cm^{-1} atribuible a la vibración de estiramiento de las bandas de OH de los grupos COOH y OH. Tampoco se puede observar un aumento de intensidad en la región 1100 - 1050 cm^{-1} . Ambos cambios serían debidos a la escisión del enlace éster produciendo un grupo carboxílico y un grupo alcohol como consecuencia de la degradación de la PCL.

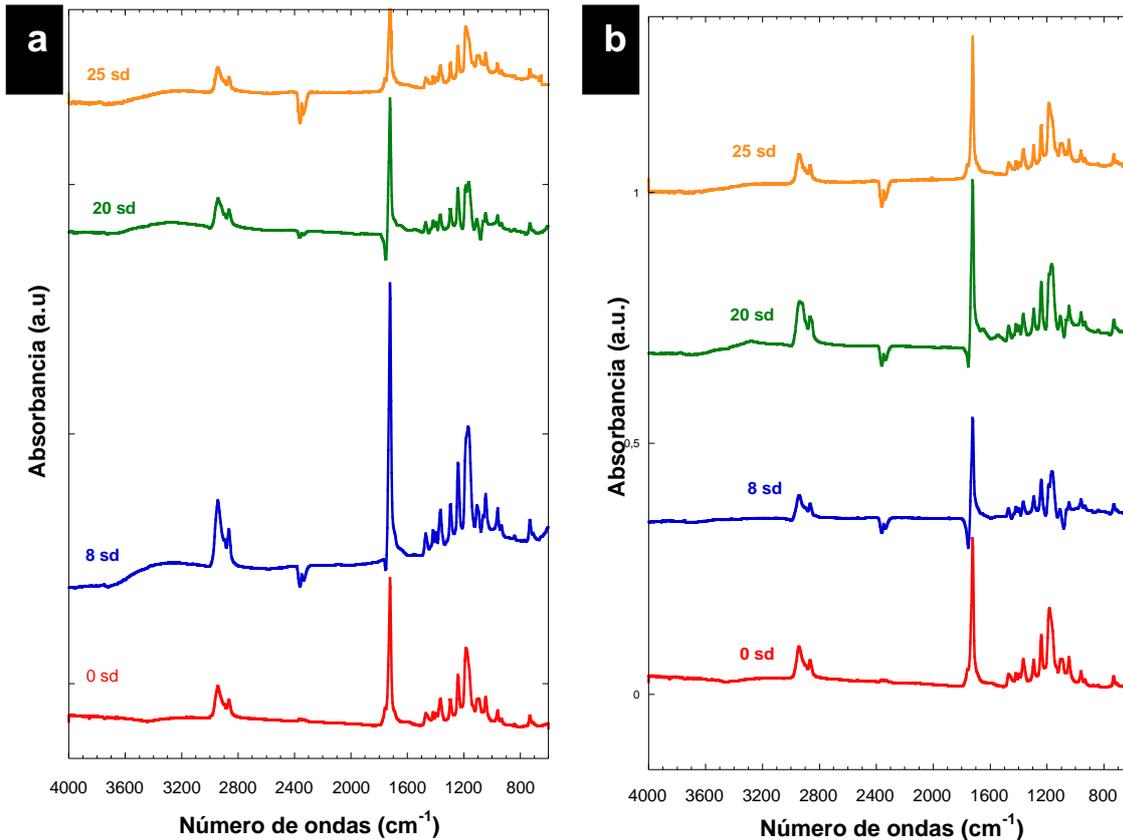


Figura 4.14.- Espectro (FTIR) de PCL-5% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (a) y PCL-10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (b) 0, 8, 20 y 25 sd

4.2.3.- Análisis Térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas de los andamios sin degradar de la serie PCL- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ se muestran en la Fig. 4.15. Los valores de las temperaturas características (T_g , T_m) así como las entalpías (de fusión y cristalización) y el grado de cristalinidad se recogen en la Tabla 4.6. La temperatura T_g de los andamios porosos de

PCL-nFe₃O₄ -59°C está cerca de los valores citados por otros autores para la PCL (~-60°C).

Tabla 4.6.-Parámetros térmicos en función del tiempo de degradación de las muestras del Sistema PCL-nFe₃O₄:

Muestra PCL tdeg(sem)	1st run		2nd run		3rd run		T _g (°C)	X _c % ^a	CF% ^b
	T _{m1} (°C)	ΔH _{m1} (J/g)	T _c (°C)	ΔH _c (J/g)	T _{m2} (°C)	ΔH _{m2} (J/g)			
0%nFe ₃ O ₄	60	107.4	26	64.7	57	83.2	-59	77	60.2
5%nFe ₃ O ₄ 0sd	60	94.6	30	60.2	58	74.1	-59	68	64
4sd	63	93.9	31	59.2	57	65.6	-58,5	67	63
8sd	64	88.7	30.5	58.6	58	65.4	-60	64	66
16sd*	63	90	30	58.1	58	65.4	-63	65	65
20sd	67	80.5	31.5	53	56.5	72.9	-63	58	65
25sd	67	77.7	31	52.4	56	68.5	-63	56	67
104sd	65	90.2	31	57.4	58	59.7	-64	65	64
10%nFe ₃ O ₄ 0sd	59	92.2	31	59.9	56	73.6	-59	66	65
4sd	63	67	31	47.2	57.5	49	-58	48	70
8sd	64	91	31	59.3	58	66.9	-61	65	65
16sd*	63	80.2	31	49.7	58	64.4	-58	57	62
20sd	66	77.5	30.5	49.4	55.5	57.6	-63	56	62
25sd	67	76.9	32	48	56	54.7	-63	55	62
104sd	65	94.3	31	55.4	57	62.2	-63	68	59
15%nFe ₃ O ₄ 0sd	59	83.1	30	52	59	69.7	-58	60	63
20%nFe ₃ O ₄ 0sd	58	81.3	30	51	58	65.9	-58	58	63

(a) X_c % = 100(ΔH_{m1}/ ΔH_{m0}); ΔH_{m0} = 139.5 J/g. (b) CF % = 100(ΔH_c/ ΔH_{m1}).

*No presentan doble pico de fusión que se puede observar en el resto de medidas.

Muestras sin degradar

Es bien conocido que PCL es un polímero hidrófobo, pero la presencia de nanopartículas de Fe incrustadas en la matriz polimérica hace que la superficie sea más hidrófila, mejorando su biocompatibilidad gracias a interacciones intermoleculares tales como enlaces por puentes de hidrógeno. Sin embargo, la adición de nanomagnetita modifica el polímero haciendo disminuir el grado de cristalinidad ($X_c\%$) de PCL, pasando de un valor de 77% en los andamios de polímero puro, a 55% en PCL-20% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, lo que demuestra que no juegan un papel estas nanopartículas de magnetita como agentes de nucleación [170].

La T_c aumenta notablemente con la adición de nanopartículas, lo que conlleva que empiezan a cristalizar más lentamente los andamios de PCL- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, confirmando que no actúan como agentes nucleantes estas nanopartículas. De hecho, actúan como restricciones físicas que podrían reducir la movilidad de las cadenas del polímero [171] [Es'haghi 2016] lo que provoca un ligero aumento del valor de T_g pasando de -59°C a -58°C para contenidos superiores al 10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ [148].

La estructura cristalina no ha sido alterada con cantidades de nanopartículas de hasta el 20%, la T_m apenas se modificó con la adición de nanopartículas con respecto al PCL puro pasando de un valor de 60°C a 58°C para la composición del 20% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$. La presencia de magnetita en los andamios produce una mayor conductividad térmica y difusividad, por lo tanto, la fusión puede ocurrir a temperaturas más bajas. Por otro lado ΔH_m disminuye claramente con el aumento de la concentración de nanopartículas llegando a disminuir desde 107 J/g para la PCL pura hasta 81 J/g para la composición con un contenido de 20% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$.

Resumiendo, las muestras con mayor contenido de nanopartículas presentan menor cristalinidad y entalpías de fusión, debido al aumento de la rigidez de las cadenas poliméricas, lo cual se hace patente tanto en el porcentaje de cristalinidad, como en la T_g .

Muestras degradadas en PBS

Durante el proceso de degradación la T_g se desplazó a temperaturas más bajas. En este sentido, la temperatura de transición vítrea se desplazó de -59°C

en la semana 0 a $-63\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la semana 104 para ambas series de materiales compuestos. La T_g está relacionada con la temperatura a la que las cadenas poliméricas adquieren movimiento: a medida que el material se degrada, se forman cadenas más pequeñas y por tanto la necesidad de una temperatura más baja para promover este movimiento. Esa disminución de T_g en relación con el tiempo de degradación *in vitro* ha sido observada por varios autores [172-174].

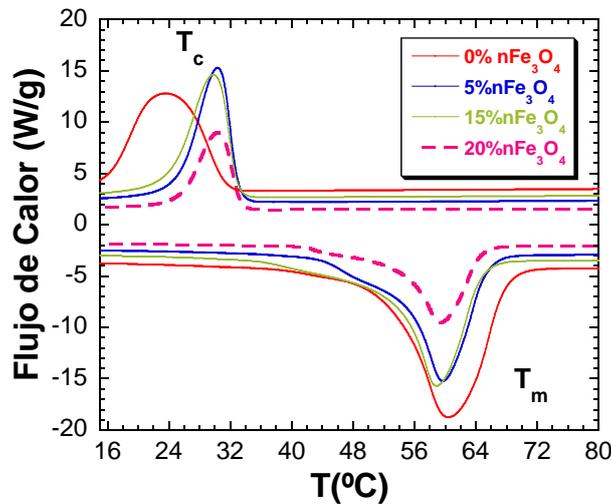


Figura 4.15.- Termograma PCL con 0, 5, 15 y 20% de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, sin degradar

El grado de cristalinidad de estas muestras apenas varió con el tiempo de inmersión. Además, se apreció un estrechamiento del intervalo de temperatura de fusión para la semana 25 en ambas composiciones.

T_{m1} cambia a una temperatura más alta 65°C para ambas composiciones para la semana 104, como se observó previamente para las muestras de PCL-nHAFe, y al mismo tiempo se observa un pico endotérmico amplio. Este comportamiento es indicativo de cristalitas de diferente tamaño: la degradación produce cadenas poliméricas de diferentes longitudes caracterizadas por diferentes temperaturas de fusión. Debemos resaltar que el acortamiento de las cadenas poliméricas no se corresponde con un aumento de cristalinidad. En cualquier caso, la presencia de cadenas poliméricas de diferentes longitudes señala que la degradación, en esta etapa, es heterogénea [137].

Curiosamente, únicamente en la semana 16 en ambas composiciones no se observó un doble pico de fusión.

La muestra degradada con un 10% de nanopartículas muestra que el %CF disminuye (del 65 al 59%, véase Tabla 4.6). Esta tendencia puede explicarse considerando que las cadenas poliméricas se han roto hasta tal punto que no pueden cristalizarse. [113].

La Figura 4.16 muestra los termogramas de DSC del primer y segundo barrido efectuado a las muestras de PCL durante las 104 semanas de de gradación. En ambas figuras se observa que a medida que transcurren las semanas, los valores de la entalpía de fusión (obtenidos al integrar las áreas bajo las endotermas de fusión) no se encontraron variaciones significativas en el primer calentamiento (ver Tabla 4.6). Este hecho se evidenció de igual manera para el proceso de cristalización, como se observa en la Figura 4.16 en donde las exotermas de cristalización de ambas composiciones no mostraron ningún cambio significativo. En la Figura 4.16 podemos observar como la fusión de las muestras degradadas comenzó a mayores temperaturas que en los andamios sin degradar.

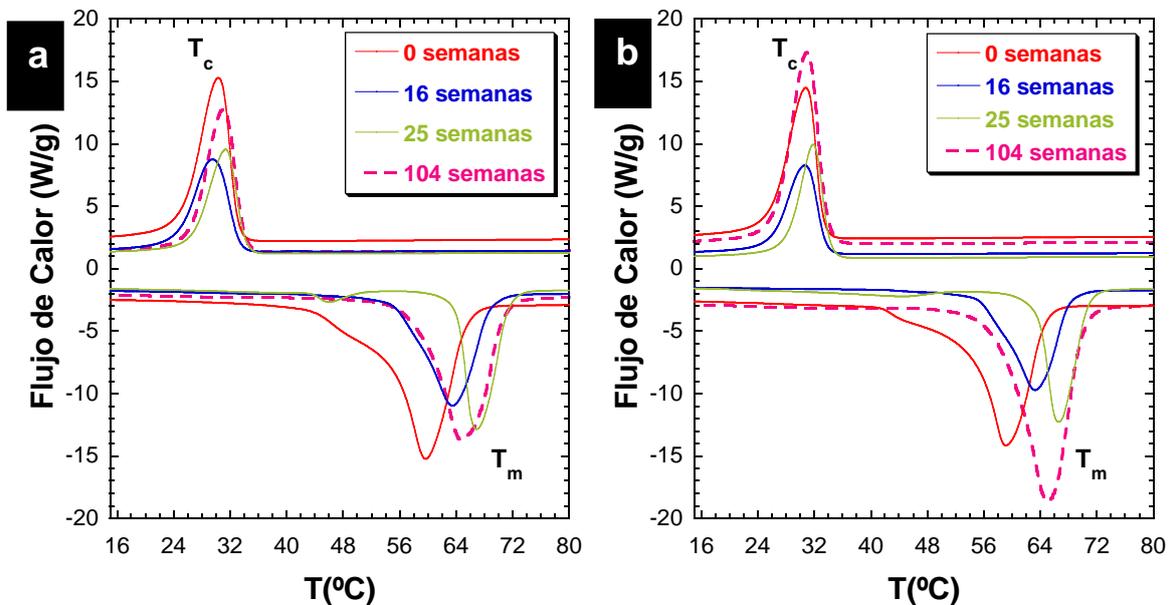


Figura 4.16.- Termograma 0, 16, 25 y 104 semanas degradación de (a) PCL-5% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ y (b) PCL-10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$.

4.2.4.- Propiedades Magnéticas (VSM)

La Figura 4.17 muestra los ciclos de histéresis de las nanopartículas de Fe_3O_4 y los andamios de $\text{PCL-nFe}_3\text{O}_4$ normalizadas al contenido de nFe_3O_4 . Los parámetros magnéticos, incluyendo la imanación de saturación (M_s) a 1,5 T, el campo coercitivo (H_c) y el contenido recalculado de nanopartículas, se presentan en la Tabla 4.7 El campo coercitivo tanto para la nanopartículas como para los andamios magnéticos son muy similares.

El valor del campo coercitivo de las partículas de magnetita pura, $\approx 12 \text{ mT}$ ($\approx 120 \text{ G}$), era muy alto para justificar un comportamiento superparamagnético. Por lo tanto, el alto valor de H_c puede asignarse a un carácter ferromagnético y quizá a la presencia de interacción entre las partículas [54]. La constancia del campo coercitivo indica que no varía la distancia media entre las partículas y confirma la buena dispersión de las nanopartículas en la matriz polimérica.

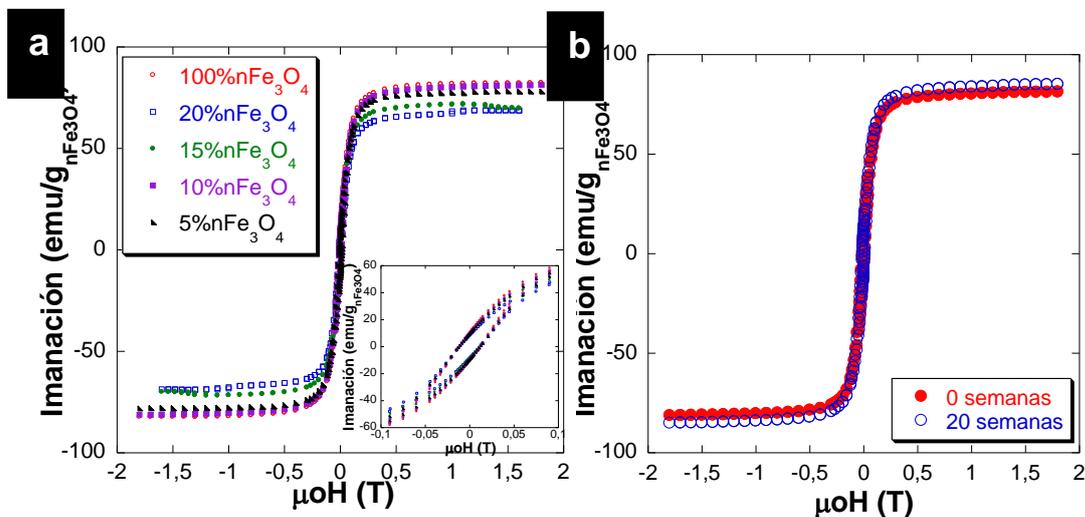


Figura 4.17.- (a) Curvas de imanación obtenidas para nFe_3O_4 y andamios de $\text{PCL-nFe}_3\text{O}_4$, detalle ciclo de histéresis ampliado (b) Curva $M(H)$ $\text{PCL-10}\% \text{nFe}_3\text{O}_4$ sin degradar y 20 semanas degradado a 37°C .

Además, valores similares de campo coercitivo indican que todas las muestras tienen el mismo comportamiento magnético. En este tipo de estructuras, las interacciones más importantes son las dipolares, de largo alcance. La

interacción dipolar puede ayudar a formar aglomerados de las partículas como indica el alto valor de campo coercitivo obtenido. Las distancias entre aglomerados magnéticos son lo suficientemente altas como para evitar las influencias mutuas.[175].

Tabla 4.7.- Imanación de saturación para 1,5 T, campo coercitivo, y contenido de nFe₃O₄ recalculado a partir de las medidas magnéticas

% nFe ₃ O ₄ Nominal	Imanación (Am ² /kg _{nFe3O4})	μ ₀ H _c (mT)	%nFe ₃ O ₄ Recalculada
100 ⁽¹⁾	82.05	11.87	—
5	78.31	11.96	4.8
10	81.05	11.92	9.9
15	75.14	11.12	13.8
20	68.80	11.42	16.8

⁽¹⁾nFe₃O₄ pura tomada como referencia.

La Figura 4.17(a). muestra los ciclos de histéresis de los compuestos de PCL-magnetita. No se observa comportamiento superparamagnético. Esto se debe a que la especificación de la partícula de Fe₃O₄ comercializada fue de diámetro mayor de 30nm. Estos composites por tanto muestran un comportamiento ferromagnético [176, 177].

En la Figura 4.17 (b) se observan las curvas de histéresis de la composición PCL-10%nFe₃O₄ sin degradar y trascurridas 20 semanas de degradación, ambas curvas se superponen, presentando parámetros magnéticos muy similares, por lo que la degradación no modifica la naturaleza ni la distribución de las nanopartículas de magnetita.

4.2.5.- Absorción de agua

La absorción de agua se midió con el fin de ayudar en la evaluación de la degradación de los andamios del sistema PCL-nFe₃O₄. Otros autores han

observado un marcado aumento de la absorción de agua coincidente con una disminución en la masa de la muestra y un aumento en las dimensiones de la muestra [178]. En nuestro estudio, no se observó hinchazón de los andamios ni una disminución dramática en la masa para ninguna composición. Sin embargo, se produjo un aumento en la absorción de agua. Estos incrementos pueden atribuirse al mecanismo de absorción de agua en los andamios. El PCL es un material altamente hidrófobo y la absorción de agua tanto en los poros del armazón como en la red polimérica es lenta. Durante los primeros días en PBS, los poros de los andamios se llenaron de burbujas de aire así como de agua. La presencia de estas burbujas de aire persiste dentro de los poros internos del andamio, bloqueando la penetración de agua. Como no se alcanza el contenido de agua en equilibrio, el contenido de agua varía en el tiempo. Por lo tanto, la variación en la absorción de agua sin los cambios correspondientes en la masa, la morfología y/o las propiedades térmicas no sugiere la degradación de los andamios poliméricos [178, 179].

Por otro lado, hay que tener en cuenta el carácter claramente alcalino de la magnetita, que puede neutralizar los productos de la degradación (monómeros), reduciendo la degradación autocatalítica del polímero [180].

Las curvas de la Figura 4.18(a) muestran que los andamios no absorbieron una gran cantidad de agua en las primeras 5 semanas de incubación, después la absorción de agua osciló ligeramente hasta la semana 12. A partir de esta semana la absorción de agua aumenta drásticamente hasta la 25, especialmente para la composición con un 10% de nanopartículas. Este comportamiento es muy diferente al presentado por el sistema PCL-nHAFé que para la semana 5 experimentó una rápida y mayor absorción.

En la semana 104, la composición con un 5% de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ presentó una mayor absorción con un 138% frente al 97% de la composición del 10% de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, se produce un cambio en la tendencia que mantenía hasta la semana 25. A pesar de esto, ambas composiciones continuaron aumentando la absorción de agua, esto nos indica un aumento en el ratio de degradación. Las nanopartículas por su carácter alcalino actúan como una barrera física que bloquea la entrada de agua al andamio, disminuyendo la velocidad de la degradación. [181].

También hemos observado hasta la semana 25, que cuanto mayor contenido de nanopartículas de magnetita contienen las muestras sometidas a degradación, mayor cantidad de agua serán capaces de absorber, y mayor será la velocidad de degradación, un comportamiento que también ha sido observado por otros autores [182]. Sin embargo, en las muestras de 2 años de degradación *in vitro* disminuye la absorción al aumentar la cantidad de nanopartículas.

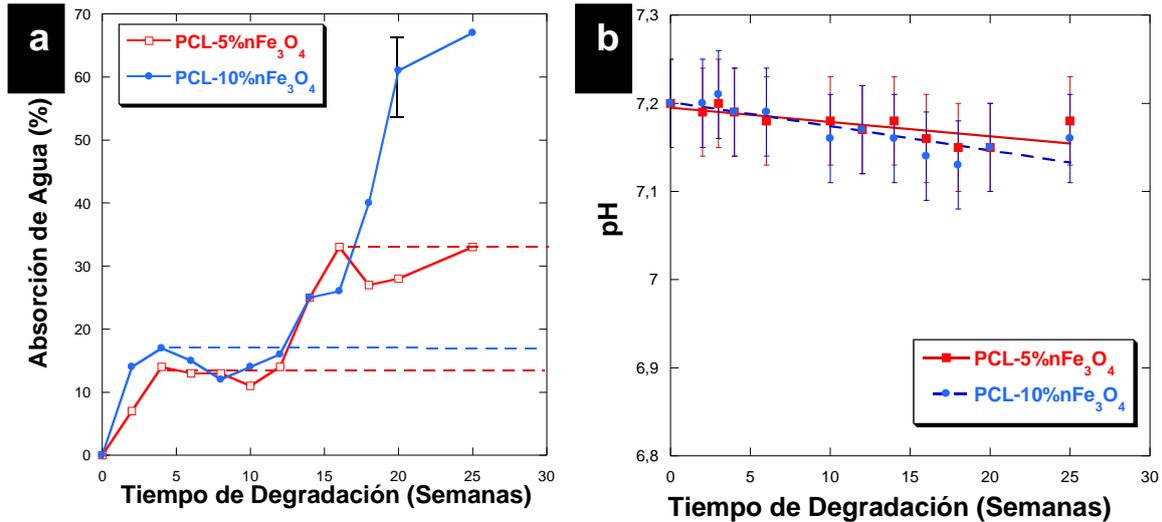


Figura 4.18.- (a) Absorción de agua, por los andamios de PCL- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, en función del tiempo de degradación (b) Variación del pH de la solución tampón fosfato frente al tiempo de degradación

4.2.6.- Variación del pH

La Figura 4.18 (b) muestra los patrones de variación del pH en PBS como una función del tiempo. El pH del PBS que contenía andamios con un 5% y con un 10% de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ en una matriz de PCL prácticamente no varió durante todo el período de degradación. En todas las muestras estudiadas, puede observarse una muy pequeña pero sostenida disminución del pH, excepto en la semana 4 de degradación en ambos andamios, que se observó un aumento del pH. El descenso en el pH es mínimo debido al carácter básico de las nanopartículas o porque realmente los productos de degradación son mínimos, parece no ser significativo en este proceso de degradación *in vitro*.

4.2.7.- Pérdida de masa y peso molecular

No se obtuvo variación de masa en la composición con menor contenido de nanopartículas durante las 25 primeras semanas, obteniéndose una pérdida mínima del 2% en la semana 104 de degradación. Estos resultados están de acuerdo con los resultados del estudio de degradación obtenido por el sistema PCL-nHAFe, que tampoco mostraron una variación apreciable. Por otro lado, la composición con un 10% de nFe₃O₄ tuvo una ligera pérdida de masa partir de la semana 14 inferior al 8%, oscilando ligeramente sin superar este valor a lo largo del periodo de degradación.

En este sistema tampoco se observó una apreciable variación en el pH ni en la masa del polímero. Por este motivo estudiamos si sufrieron cambios significativos los valores de M_w , M_n e I , que están directamente relacionados con la longitud de las cadenas de polímero y la dispersidad de su peso molecular, como se puede observar en la Tabla 4.8.

La introducción de nanopartículas de Fe₃O₄ retrasó el inicio del proceso de degradación como hemos visto en los apartados anteriores, lo que es evidente por la pequeña variación tanto en la masa molecular como en el peso molecular en la semana 25.

En la Tabla 4.8. se puede ver como el peso molecular promedio en peso disminuye a partir de la 25 semana de degradación para ambas muestras sometidas a estudio. La concentración de nFe₃O₄ no afecta considerablemente a la velocidad de degradación de las muestras al sufrir una disminución en el peso molecular (M_w) similar.

En la Tabla 4.8 podemos observar como las muestras con menos nanopartículas tienen un índice de polidispersidad ligeramente mayor en la semana 104, lo que indica que existen más cadenas macromoleculares con diferentes pesos moleculares como consecuencia del aumento en la escisión de los enlaces. Se confirma el cambio de comportamiento hasta la semana 25 y en las muestras de 104 semanas entre las dos composiciones; al igual que sucedía con la absorción de agua.

Tabla 4.8.- M_w , M_n , e I del Sistema PCL- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$.

Muestra	Tiempo de degradación (semanas)	M_w	M_n	I
PCL	0	134418	92103	1.459
PCL-5% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$	25	143410	97073	1.477
	104	99888	61754	1.617
PCL-10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$	25	139433	90264	1.545
	104	86212	54070	1.594
PCL-15% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$	0	134441	95866	1.402

Capítulo 5

Caracterización del sistema PLLA-NPMs. Estudio de degradación

En este capítulo de la memoria se realiza una descripción y discusión de los resultados obtenidos de la degradación in vitro durante 25 semanas de los andamios del polímero PLLA-nHAFé en el primer apartado y del sistema PLLA-nFe₃O₄ en el segundo apartado.

Es esencial comprender el efecto de los compuestos añadidos sobre la degradación de la matriz. Varios estudios se han llevado a cabo sobre la degradación de este poli- α -hidroxiácido [22, 150, 172, 183-190]. Algunas propiedades de las diferentes combinaciones de materiales pueden estimarse basándose en estudios anteriores, pero usualmente el comportamiento de degradación es característico para cada combinación de material de relleno/matriz lo que hace complicada la predicción. Por lo tanto, es necesario determinar el efecto del compuesto añadido sobre el comportamiento de degradación del material [160].

La cantidad de polímero en el sistema es un parámetro que influye sobre las características de los soportes porosos producidos. Cuando la concentración en polímero crece, la densidad del andamio y la cantidad de solvente residual aumentan, mientras que la porosidad baja [128, 129, 169, 191-193]. Nuestros andamios han sido fabricados con tan sólo un 2.5% de polímero en peso respecto al volumen de disolvente, para asegurarnos un alto porcentaje de porosidad.

Debido a que el campo magnético estático ha sido descrito como inductor de la diferenciación osteoblástica [176, 194-198], el objetivo de este estudio fue desarrollar compuestos biodegradables magnéticos basado en una matriz PLLA y nanopartículas de Fe₃O₄ y de nHAFé.

Además, se ensayaron las propiedades químicas, térmicas y magnéticas de estos nuevos materiales previamente al proceso degradativo y durante 25 semanas de degradación.

5.1.- SISTEMA PLLA/nHAFe. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN *IN VITRO*.

En este apartado vamos a estudiar la degradación *in vitro* de las siguientes composiciones de PLLA: con 10, 30 y 70% de nHAFe respecto del total de la masa del polímero, durante 25 semanas.

Este sistema únicamente ha sido estudiado en forma de micro-nanosferas de ácido poli (L-láctico) revestidas con hidroxiapatita dopada con hierro en un 1, 5, 10 y 30% de estas nanopartículas [84]; sin embargo no se han realizado estudios de degradación *in vitro*.

La superficie hidrófoba de PLLA limita la unión celular, esta limitación se supera mediante la adición de nHAFe [189]. Además, la nHAFe puede tener otras propiedades especiales debido a su pequeño tamaño y la gran superficie específica. También ha demostrado un aumento significativo en la adsorción de proteínas y la adhesión de la célula osteoblástica en los materiales cerámicos de tamaño nano en comparación con la cerámica micronizada tradicional [189, 197, 199].

5.1.1.-Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la presente tesis, se ha estudiado la morfología de los andamios y cómo se ve afectada ésta por la adición de nanopartículas biomiméticas en un amplio rango de composiciones entre el 10%-70% de nHAFe (veáse Figura 5.1).

En la Figura 5.1(a, c y d) micrografías de andamios PLLA-10%nHAFe, se puede apreciar que estos andamios poseen una morfología anisotrópica tubular con estructura interna similar a la de una escalera, típica de la separación sólido-líquido; observable a diferentes aumentos, con un tamaño de poro entre 25-250 μm . Mientras que las composiciones con un 30% y 70% de nanopartículas no presentan este tipo de morfología. Al aumentar la cantidad

de nanopartículas en la matriz de PLLA se obtienen poros de menor tamaño, entre 15-180 μm con una estructura de poro más isótropa.

Las partículas de nHAFé en la solución de polímero perturban en cierta medida la cristalización del disolvente y de este modo hacen que la estructura de poros sea más isotrópica [200].

Las composiciones con un contenido en nHAFé mayor del 10% presentaban rasgos topográficos curiosos típicos del mecanismo de nucleación y crecimiento perceptibles a grandes aumentos (Figura 5.1 (e-h)). De hecho, la superficie de las paredes de los poros contiene estructuras de tipo colina, con pequeños picos (círculos verdes), que dan a las paredes de los poros un patrón de micro-rugosidad [169, 201].

La cantidad de nanopartículas en los soportes porosos afecta al mecanismo de separación de fases, para composiciones menores del 30% de nanopartículas presentan un mecanismo de separación de fases sólido-líquido; mientras que para composiciones con mayor proporción de nHAFé se produce un mecanismo de separación de fases líquido-líquido. Aunque otros autores aseguran que en andamios fabricados mediante TIPs, el mecanismo de separación de fases más frecuente es el mecanismo de descomposición espinodal, nuestros resultados no coinciden con estos investigadores observándose separación de fases líquido-líquido mediante mecanismo de nucleación y crecimiento. [191, 202].

El tamaño de poro también se ve afectado por la presencia de gran cantidad de nanopartículas disminuyendo el tamaño de poro y haciéndose más densas las paredes para las composiciones con un contenido de 30 y 70% de nHAFé y con una morfología más dispersa.

A simple vista, estos andamios, no mostraron diferencias apreciables con respecto a los andamos sin degradar, estando la estructura libre de defectos transcurridas 25 semanas del comienzo del experimento.

Los soportes porosos presentaron una alta porosidad con una gran superficie específica, que podría ayudar a dispersar los productos ácidos de autocatálisis, haciendo que esta se minimice, ayudado por la gran interconexión de poros que se aprecia en todas las micrografías. Athanasiou [203] ha demostrado que

implantes de baja porosidad se degradan más rápido que los implantes de alta porosidad. Esto puede deberse a una autocatálisis mejorada en aquellos compuestos, que son incapaces de evacuar los subproductos de degradación ácida [203-205].

Después de varias semanas de degradación *in vitro* se observa un cambio en la morfología de la superficie (Figura 5.1 (b, d)), que pasa de tener un aspecto suave a más rugosa. Esto se debe a que durante el proceso se va formando de forma gradual una capa de nHAFé, material bioactivo, desde la superficie del andamio hasta los poros internos [188, 193, 206].

En la composición PLLA-30%nHAFé (Figura 5.1 (b)) se aprecia como empiezan a aparecer microporos (círculos rojos) en las paredes del esqueleto del andamio en la semana 8 de degradación, observándose también aglomeración de partículas en las paredes del soporte poroso (círculos azules); frente a las paredes más limpias de la composición PLLA-10%nHAFé (Figura 5.1 (c)).

Por otro lado, conforme avanza el proceso degradativo los poros se hacen más pequeños y alargados (Figura 5.1 (d), (f) y (h)); apareciendo una mayor microporosidad sobre todo en la composición con un contenido de un 30%nHAFé.

Figura 5.1 (h), en esta muestra se puede observar la hidroxiapatita como agregados por toda la muestra. La distribución de la misma en una capa homogénea cubriendo las paredes de la estructura, no aparece ocluyendo los poros, pero si disminuyendo su tamaño drásticamente.

Del análisis de los resultados experimentales de SEM podemos afirmar que no se encontró ningún producto de la degradación, no habiendo evidencias morfológicas de degradación, salvo la disminución de tamaño y el estiramiento de los poros.

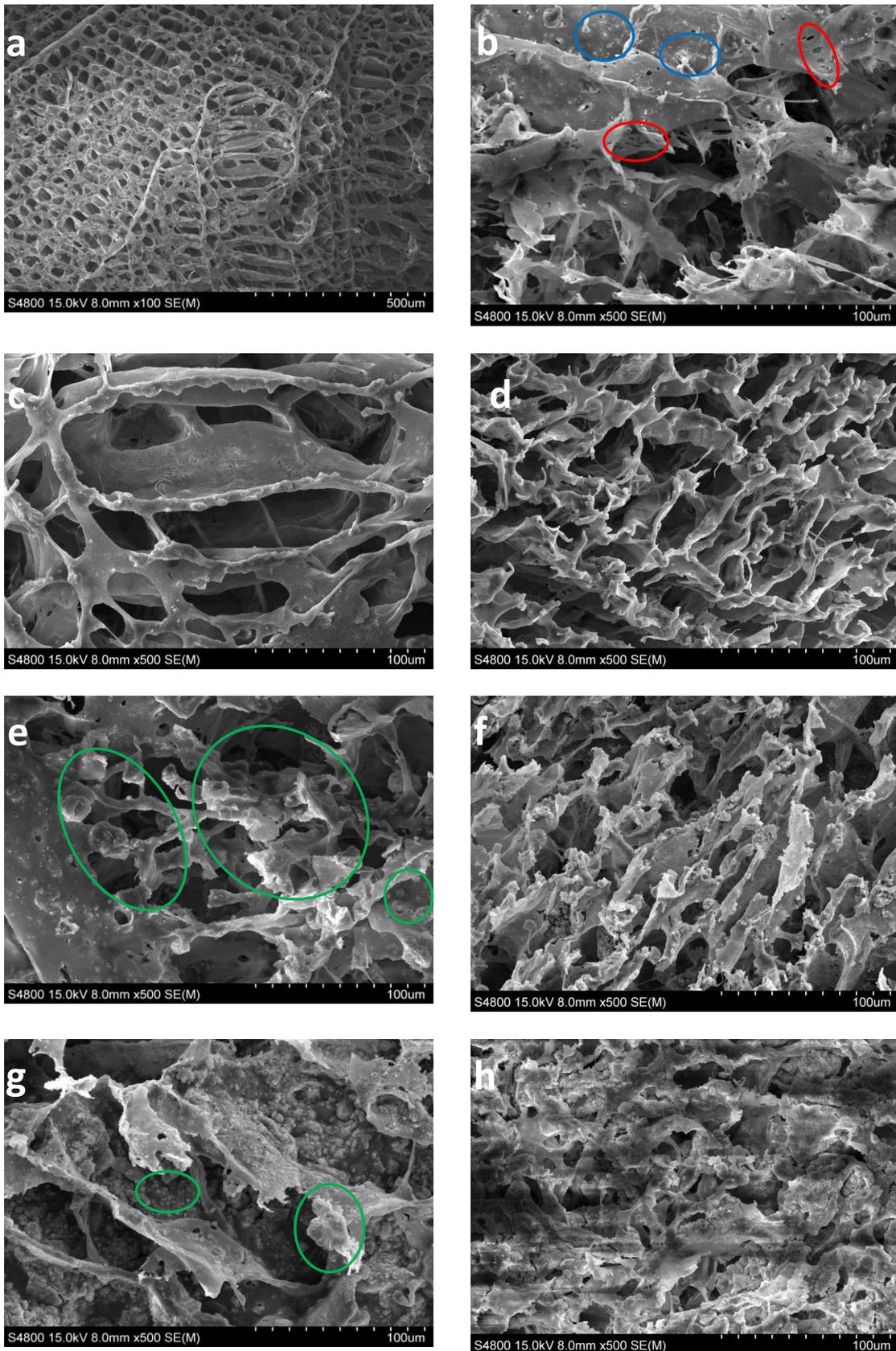


Figura 5.1.- SEM (a) PLLA-10%nHAFc 0sd a 100X, (b) PLLA-30%nHAFc 8sd, (c) PLLA-10%nHAFc 0sd, (d) PLLA-10%nHAFc 25sd, (e) PLLA-30%nHAFc 0sd, (f) PLLA-30%nHAFc 25sd, (g) PLLA-70%nHAFc 0sd, (h) PLLA-70%nHAFc 25 sd

5.1.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopia Infrarroja, FTIR

Tanto los andamios de PLLA puro y de PLLA-nHAFé, como las partículas de nHAFé fueron inicialmente analizados mediante la técnica de FTIR, utilizando un ATR, para no modificar la muestra.

Como algunos de los enlaces químicos podrían romperse y otros podrían ser generados en la hidrólisis, indirectamente todos estos síntomas se pueden encontrar en las curvas de FT-IR. En este estudio, se suponía que el crecimiento y desplazamiento de los picos mostraría la generación de enlaces químicos y los caracteres de enlace dependiendo del estado o la posición a lo largo de la cadena del polímero para las muestras sometidas a degradación *in vitro*.

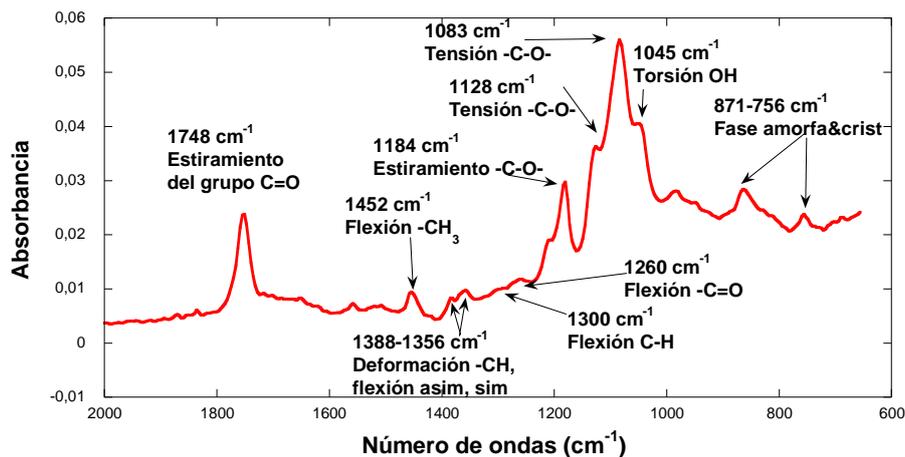


Figura 5.2.-Espectro FTIR de PLLA puro

En la Figura 5.2 podemos ver que las bandas de absorción del polímero PLLA puro y en la Figura 5.3 los espectros de PLLA puro, PLLA-70%nHAFé y de las nanopartículas nHAFé. Observamos como varían ligeramente de posición alguna de las bandas, lo cual nos indica que existe interacción entre las nanopartículas y el polímero.

Los espectros de los andamios PLLA-nHAFé muestran bandas típicas del polímero ligeramente desplazadas a aprox. 1.760 (estiramiento C=O) en forma de hombro, 1265 (flexión C=O), 1187 (estiramiento -C-O-) y 1.090 cm⁻¹ (tensión

-C-O-)[207]. La primera banda podría estar relacionado con las vibraciones de estiramiento ($\nu_{C=O}$) de los grupos carbonilo del PLLA, interactuando con los cationes de calcio e hierro de la superficie de la nHAFé, produciéndose el desplazamiento de esta banda situada a 1748 cm^{-1} en el PLLA puro [84, 139, 207]. El pico situado a 1045 cm^{-1} presente en el polímero puro, se solapa con la banda $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ situada entre $1087\text{-}1032\text{ cm}^{-1}$ de la nanohidroxiapatita. Cabe destacar la aparición de bandas invertidas en los espectros de compuestos PLLA-70%nHAFé. Esta forma anómala banda IR se debe al "efecto Christiansen" [139].

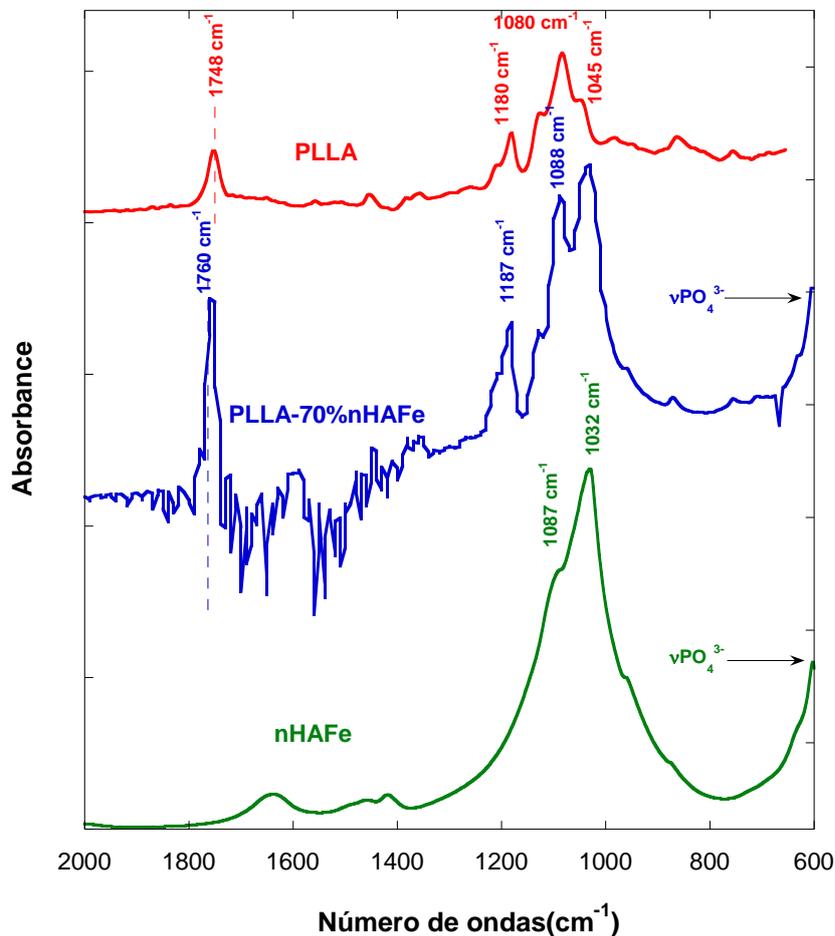


Figura 5.3.-Espectro FTIR de nHAFé, PLLA-70%nHAFé y de PLLA

A partir de la curva de PLLA-70%nHAFé de la Figura 5.3, se observan los modos ν_1 , ν_3 y ν_4 de vibración del grupo PO_4^{3-} , el modo ν_1 está presente a 962

cm^{-1} , el modo ν_3 de se muestra a 1087 y 1032 cm^{-1} , y se intuye la banda a 603 cm^{-1} que se atribuye al modo de vibración ν_4 . Se observa que hay picos de doblete a 1457 y 1420 cm^{-1} atribuidos al modo vibración $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ que es un ion carbonato de tipo B deficiente en Ca [208].

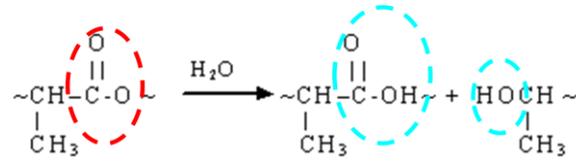


Figura 5.4.- Esquema de la degradación del PLLA:

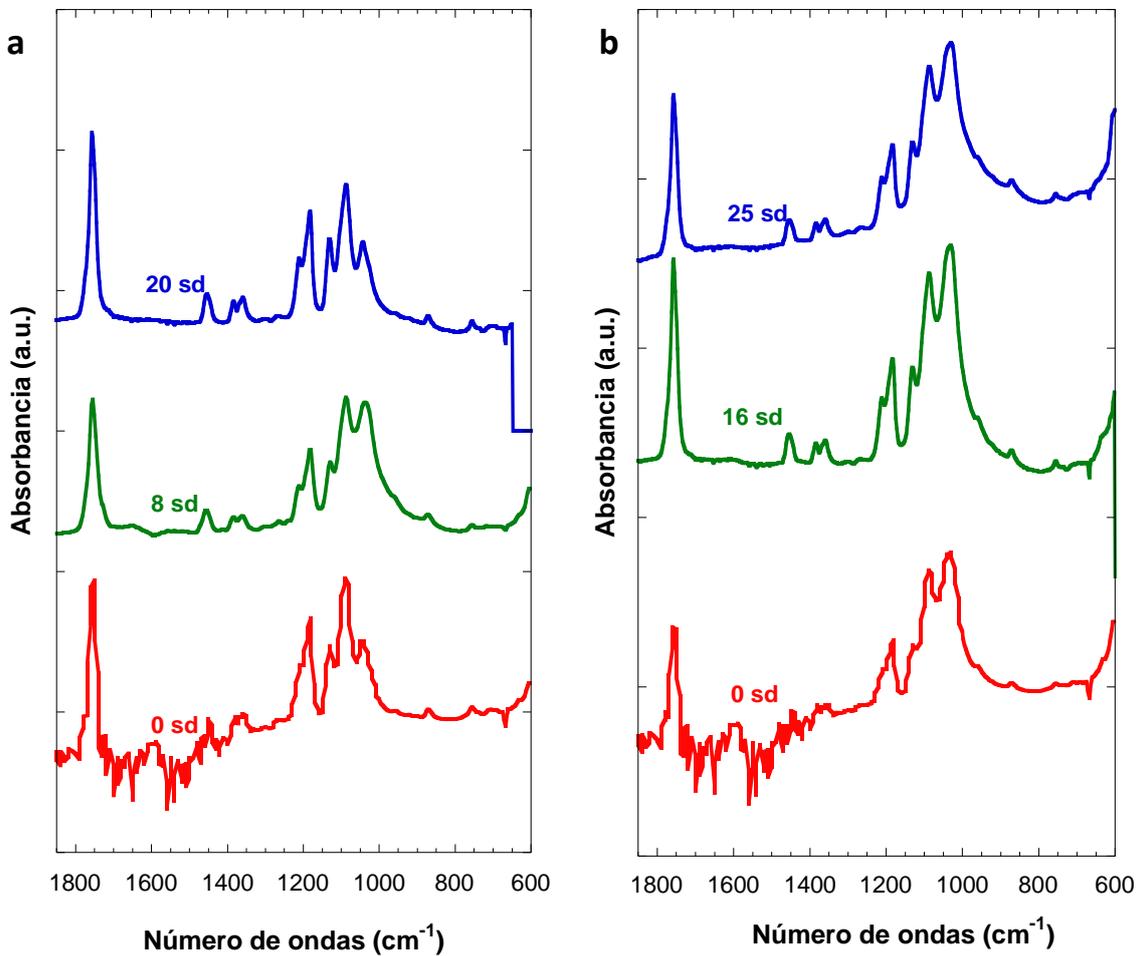


Figura 5.5- Espectro (FTIR) (a) PLLA-30%nHAFc de 0, 8 y 20 sd y (b) PLLA-70%nHAFc de 0, 16 y 25 sd

A continuación, estudiaremos el proceso de degradación hidrolítica en el sistema PLLA-nHAF_e, en la Figura 5.4 vemos que enlaces se pueden romper durante el período de incubación en PBS. En las figuras 5.5 (a) y (b) no pudo observarse un cambio consistente en la banda de 1760 cm⁻¹ debido a la saturación de la misma, No obstante, Partini et al. en su análisis de la degradación hidrolítica de poliésteres alifáticos mediante FTIR centra su estudio en la banda a 1570 cm⁻¹ correspondiente a grupos finales carboxílicos. En dicho estudio la banda 1570 cm⁻¹ no es apreciable para el poliéster sin degradar, mientras que en el transcurso de la degradación comienza a aparecer [209]. No observamos la aparición de la banda de final de carbonilo en ninguna de las composiciones, (Figuras 5.5 (a) y (b)), por tanto no existen indicios de degradación en este sistema durante las 25 semanas de degradación *in vitro*.

5.1.3.- Análisis Térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En este estudio, hemos realizado un análisis de las propiedades térmicas del material de partida y la evolución en función del tiempo de hidrólisis, con la finalidad de comprender como las características y propiedades del sistema están siendo afectadas por el proceso de degradación *in vitro*.

El ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) permitió observar el comportamiento térmico del sistema PLLA-nHAF_e según se fabricó mediante TIPs (Figura 5.6(a)). En el primer barrido se observa (calentamiento controlado) además de un pico endotérmico de fusión en algunas de las composiciones un pico exotérmico de cristalización en frío; una alteración de la línea base correspondiente a T_g ubicada entre 57-61°C, y justo a continuación de la T_g , en algunas composiciones (Figura 5.6(a)) se observa un pico que se atribuye a un proceso de envejecimiento característico de polímeros con una T_g situada por encima de la temperatura ambiente.

En el segundo barrido (enfriamiento controlado) se puede observar una exoterma de cristalización, y una alteración de la línea base T_g .

En la Tabla 5.1 se recogen los principales parámetros térmicos, para este sistema.

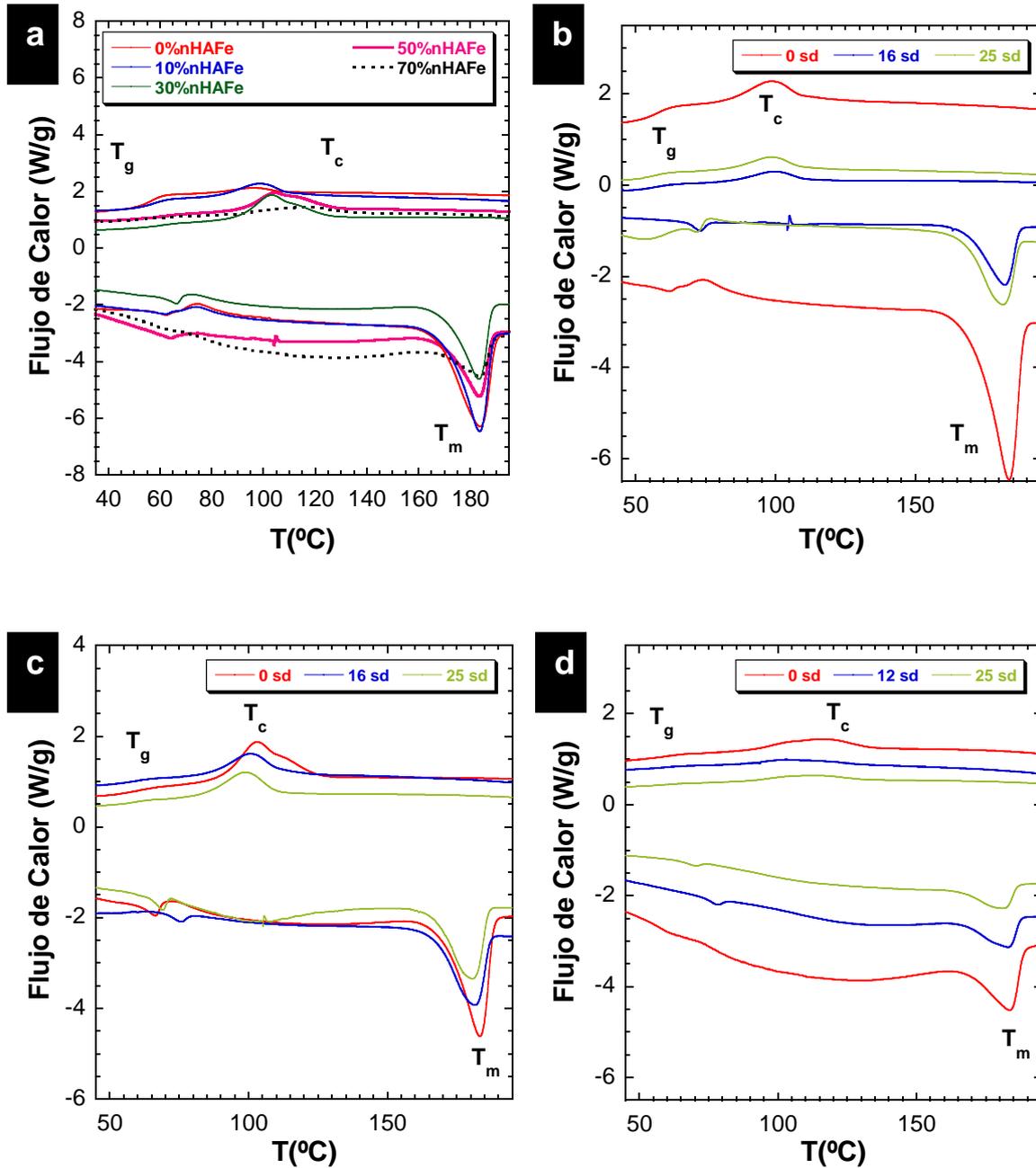


Figura 5.6.- Termogramas (a) PLLA con 0, 10, 30, 50 y 70%*nHAFe*, (b) PLLA-10% *nHAFe* 0, 16 y 25 sd, (c) PLLA-30% *nHAFe* 0, 16 y 25 sd, (d) PLLA-70% *nHAFe* 0, 12 y 25 sd

La temperatura de fusión de un polímero (T_m) está determinada por el tamaño y la perfección de los cristales que éste forme (i.e. el espesor lamelar) [210]. El PLLA puede formar cristales de mayor tamaño y perfección cristalina que el PLA, obteniéndose valores de T_m que pueden llegar hasta 180°C. Así mismo, la

intensidad del pico de fusión es significativa, guarda una relación directa con el número total de cristales (i. e. la fracción cristalina) que existen en el material en el momento en que ocurre la fusión. El número total de cristales está constituido por los cristales inicialmente existentes en el material más los cristales que se pueden formar durante la cristalización en frío.

La T_g se obtuvo a partir del ciclo de enfriamiento (2º barrido), en el que esta transición no se solapa con el pico que se atribuye al proceso de envejecimiento.

Muestras sin degradar

La adición de cantidades inferiores al 20% de nanohidroxiapatita en los andamios de PLLA, tiene efecto nucleante al aumentar la cristalinidad ($X_c\%$) ~13%, pasando de 39% en el polímero puro a 44% en el andamio con menor cantidad de nanopartículas. Mientras que adiciones superiores, modifican el polímero haciendo disminuir drásticamente el grado de cristalinidad del PLLA, de 44% en el andamio con un 10% nHAFe, a 5% en el andamio con un 80% nHAFe, dificultando la cristalización y reduciendo la movilidad de las cadenas [170, 171].

Mientras se produce una disminución de la cristalinidad, el valor de la capacidad de cristalización de un polímero ($CF\%$) aumentó considerablemente con la adición de nanopartículas, desde el 6% para el polímero puro hasta ~64% en la composición del 30% de nHAFe. El $CF\%$ está relacionado con la longitud de las cadenas poliméricas. Si la longitud de la cadena polimérica se reduce por la adición de nanopartículas, estas cadenas más cortas cristalizarán más fácilmente en el segundo barrido y $CF\%$ aumentará [138].

Por otro lado, la T_c aumenta hasta un 21% con la adición de nanopartículas, lo que conlleva que empiezan a cristalizar más lentamente los andamios de PLLA-nHAFe al cristalizar a mayor temperatura. Las partículas, actúan como restricciones físicas reduciendo la movilidad de las cadenas del polímero, produciéndose un ligero aumento del valor de T_g de 56°C en el PLLA puro a 61°C para contenidos del 30 y 50% nHAFe; para concentraciones en nanopartículas por encima del 50% la T_g baja hasta volver alcanzar el valor de 57°C.

Tabla 5.1.-Análisis térmico del sistema PLLA-nHAFe:

PLLA/ %nHAFe t _{deg} (sem)	1 ^{er} Barrido				2 ^o Barrido			X _c % ^a	CF% ^b
	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	T _{cc} (°C)	ΔH _{cc} (J/g)	T _g (°C)	T _c (°C)	ΔH _c (J/g)		
0% 0sd	184	41.1	76	4.7	56	96	2.3	39	6
10% 0sd	183	44.1	75.5	3.4	58.5	98	9.7	44	22
4sd	183	41.8	76.5	2.3	58	97	8.8	42	21
8sd	182	43.2	75	1.9	59	97	6.9	44	16
12sd	182	44			58	98	6.8	47	15
16sd	182	40.7			57	99	6.4	44	16
20sd	182	40.1	77.5	1.5	58	97	5.7	42	14
25sd	181	38	77	2.7	56	98	5.2	38	14
20% 0sd	184	36.1	76.1	4.9	60	101	18.2	33.5	50
30% 0sd	183	31.7			61	103	20.4	34	64
4sd	183	24.2	77	2.5	62	105	19	23	78
8sd	182	28.8	77	1.43	61	102	17	29	59
12sd	182	29	86	1.3	61	103	15	30	52
16sd	181	30.3			58	100	12	33	40
20sd	181	28.6	74	2.3	57	98.5	10	28	35
25sd	181	27.5	73	2.1	59	98	10.8	30	39
50%0sd	183	21.6			61	104	11.6	23	54
70%0sd	184	10			57	114	6.4	11	64
4sd	183	10.7	76	1.2	58	114	5.1	12	48
8sd	184	9.1	99	0.4	61	111	4	9	44
12sd	183	9.4	100		59	103	4	10	42
20sd	183	8.5	99	0.8	59	105	2.6	8	30
25sd	182	9.2	91	2.9	59	110	4	10	43
80%0sd	185	4.7			59	116	2.1	5	45

(a) $X_c \% = 100[(\Delta H_{m1} - \Delta H_{cc}) / \Delta H_{m0}]$; $\Delta H_{m0} = 93 \text{ J/g}[153][Fisher 1993]$. (b) $CF \% = 100(\Delta H_c / \Delta H_{m1})$.

La adición de hasta un 20% nHAFé no tiene un efecto significativo sobre sus temperaturas características: T_g , T_m , T_c [169]. Para cantidades superiores de nanopartículas T_g y T_m no experimentan una gran variación.

En el caso de las nuestras sin degradar, su temperatura de fusión no fue apenas alterada con respecto al polímero puro tomando un valor $\sim 184^\circ\text{C}$, T_m ; su estructura cristalina no ha sido alterada, una temperatura de fusión tan alta indica gran perfección y tamaño de los cristales formados. Mientras que la intensidad del pico de fusión, relacionado con el número total de cristales, disminuye al ir aumentando la cantidad de nanopartículas en el andamio.

Por otro lado el área bajo el pico de fusión, entalpía de fusión (ΔH_m), disminuye claramente con el aumento de la concentración de nHAFé, salvo para la composición con un contenido del 10% de nanopartículas que aumento a 44,1 J/g siendo la entalpía de fusión del polímero puro de 41,1 J/g; mientras que para adiciones superiores al 10% de nanopartículas disminuye hasta 4,76 J/g para los andamios con un contenido de 80% nHAFé.

En resumen, las muestras con mayor contenido de partículas de nHAFé disponen de menor cristalinidad y entalpías de fusión. Esto se debe al aumento de la rigidez de las cadenas poliméricas, verificándose tanto en el porcentaje de cristalinidad, como en la temperatura de transición vítrea.

Muestras degradadas en PBS

El estudio de la región de transición vítrea permitió analizar el efecto de la degradación sobre las cadenas moleculares amorfas. Se produjo un pequeño desplazamiento de la T_g a temperaturas más bajas cuando el tiempo de degradación aumentó para contenidos menores del 70% nHAFé. Mientras que para la composición del 70% de nanopartículas aumentó ligeramente. La degradación no tuvo ningún efecto significativo sobre el andamio, apenas varió la T_g a lo largo de las 25 semanas de degradación *in vitro*.

En polímeros semicristalinos sometidos a degradación *in vitro*, durante una primera etapa, la cristalinidad de la muestra incrementa rápidamente hasta alcanzar su máximo y posteriormente disminuye. Este efecto es debido a la desaparición de la porción amorfa con un menor empaquetamiento que facilita

el acceso del medio hidrolítico [211]. Únicamente en la semana 12 de degradación la composición con un 10% nHAFé, experimento un aumento de la cristalinidad que no alcanzó el 7%. La cristalinidad en este sistema PLLA-nHAFé disminuyó al final de las 25 semanas de degradación *in vitro*; siendo mayor esta disminución para la composición de 10% nHAFé ($X_c\%$ disminuyó ~14%) y menor en la composición de 70% de nanopartículas ($X_c\%$ descendió hasta ~9%). Esto es consistente con los resultados obtenidos por Tsuji et al. [212] en la degradación hidrolítica de PLLA en PBS. Estudios anteriores de degradación en muestras porosas PLLA con menor cristalinidad inicial [46] presentaron mayores tasas de degradación (30% de pérdida de peso después de 40 semanas) y un aumento en la cristalinidad con el tiempo de degradación [190, 212].

La T_m disminuyó ~2% durante el transcurso de la degradación en todas las composiciones. Este hecho se evidenció de igual manera para el proceso de cristalización, como se observa en las Figuras 5.6 (b, c y d) en donde las exotermas de cristalización de todas las composiciones no mostraron ningún cambio significativo.

En las Figuras 5.6 (a, b y c) se muestran los termogramas de fusión (correspondientes al primer y segundo barrido), efectuado a las muestras del sistema PLLA-nHAFé durante las 25 semanas de degradación *in vitro*. En todas las composiciones se observa que a medida que transcurren las semanas, los valores de la entalpía de fusión disminuyeron desde un ~14% para la composición 10% nHAFé, hasta un descenso ~8% en la composición 70% nHAFé (ver Tabla 5.1).

Las propiedades térmicas de las diferentes muestras no mostraron cambios significativos con la presencia de nHAFé (Figura 5.6 (a)), tampoco es apreciable cambio alguno a lo largo de todo el proceso de degradación. En las Figuras 5.6 (b, c y d). se puede comparar los termogramas de las distintas composiciones del sistema PLLA-nHAFé sin degradar con los de las diferentes muestras al final de la degradación. Los valores de T_g se recogen en la Tabla 5.1, tanto las muestras sin degradar como las degradadas no presentaron cambios significativos ni con el aumento de nanohidroxiapatita ni con el proceso de degradación *in vitro*.

5.1.4.- Propiedades Magnéticas

La Figura 5.7 muestra los ciclos de histéresis a 37°C, de los andamios de PLLA-nHAFe medidos en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM). Los parámetros magnéticos: imanación de saturación, M_s a 1,5 T, campo coercitivo, H_c y el contenido de nanopartículas recalculado en el composite se recogen en la Tabla 5.2. El valor de los campos coercitivos tanto para la nanoadición como para los andamios magnéticos son muy similares: $\mu_0 H_c = 2-3$ mT (20-30 G).

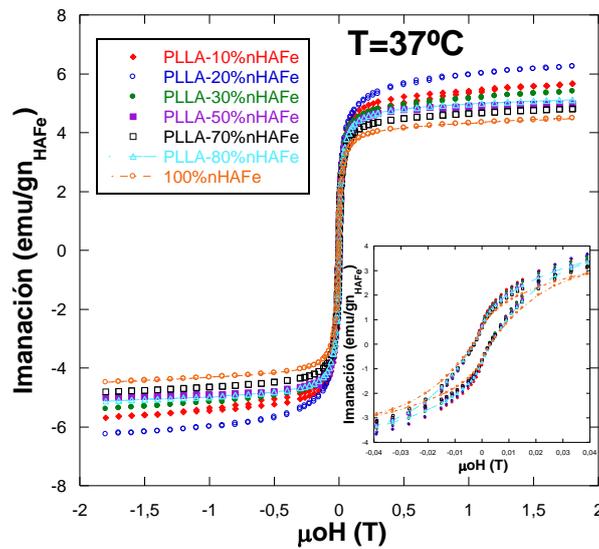


Figura 5.7.- Curvas de imanación obtenidas para nHAFe y de los andamios de PLLA-nHAFe, detalle ciclo de histéresis “wasp-waisting” ampliado

La composición nominal PLLA-80%nHAFe, presentó el $\mu_0 H_c$ más pequeño, 2,27 mT, pero no lo suficientemente bajo como para surgir del comportamiento superparamagnético (SPM) puro. Las distancias entre los diferentes aglomerados magnéticos son lo suficientemente altas como para evitar las interacciones mutuas, como se pone de manifiesto por el H_c tan bajo a pesar de ser el composite de mayor concentración de nanopartículas [175]. La interacción entre partículas justifica el comportamiento ferromagnético de las distintas composiciones, lo que también se confirma por la rápida saturación de las curvas.

La forma de la curva de histéresis, que se muestra en el inserto de la figura 5.7, indica que la hidroxiapatita sintetizada contiene dos fases magnéticas, una con una alta fuerza coercitiva $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ y otra con una fuerza coercitiva baja $n\text{HAFe}$, Estas curvas de histéresis se denominan de cintura de avispa como ya comentamos en el sistema PCL- $n\text{HAFe}$ [97].

Tabla 5.2.- Imanación de saturación a 1,5 T, campo coercitivo, y contenido de nHAFe recalculado a partir de las medidas magnéticas:

% nHAFe	Imanación	$\mu_0 H_c$	%nHAFe
Nominal	($\text{Am}^2/\text{kg}_{n\text{HAFe}}$)	(mT)	Recalculada
100 ⁽¹⁾	4.45	3.18	—
10	5,58	2,77	12,5
20	6,16	2,73	27,6
30	5,33	2,64	36
50	4,86	2,65	54,5
70	4,77	2,50	74,9
80	4,86	2,27	87,2

⁽¹⁾ $n\text{HAFe}$ pura tomada como referencia.

5.1.5.- Absorción de agua

En este apartado vamos estudiar las curvas de absorción de agua a lo largo del tiempo de permanencia en PBS, para evaluar el comportamiento de degradación de los andamios de PLLA- $n\text{HAFe}$. Estas curvas muestran que la introducción de partículas magnéticas biomiméticas en los andamios poliméricos incrementa su capacidad de absorción de agua.

En la Figura 5.8 (a) podemos observar que con la extensión del tiempo de degradación, la absorción de agua de las diferentes muestras se incrementó gradualmente, alcanzando todas las muestras un aumento significativo en la semana 3 de incubación, superando el 100% de agua absorbida, las composiciones con mayor cantidad de nanopartículas (30 y 70% $n\text{HAFe}$).

Suavizando posteriormente el aumento de agua absorbida. Todos los andamios absorbieron una gran cantidad de agua y alcanzaron el máximo de absorción al final del periodo de incubación. Es obvio, que la adición de nHAFe en el PLLA aumentó la absorción de agua, siendo los andamios con 10%nHAFe de PLLA los que mostraron menor absorción a lo largo del periodo de incubación [22].

Los resultados mostraron que la adición de estas nanopartículas mejoró la hidrofiliidad de la superficie del PLLA.

El comportamiento del índice de hinchamiento está influenciado por el grado de cristalinidad y el peso molecular de la muestra. Es decir, a mayor cristalinidad y mayor peso molecular, menor será el hinchamiento, ya que la difusión de la solución al interior del polímero se da más fácil a través de las zonas amorfas que de las zonas cristalinas. Es por esto que las muestras analizadas presentan un alto índice de hinchamiento, por presentar una mayor proporción de zonas amorfas [213].

Comparando las muestras analizadas, se encontró que el porcentaje de absorción de agua es mayor para la muestra PLLA-70%nHAFe, debido a que ésta presentó menor peso molecular inicial, M_n , y como vimos en el análisis térmico, presenta un porcentaje de cristalinidad menor (11%), lo que facilita una mayor difusión de la solución de PBS al interior del polímero, como afirman otros investigadores [213].

Las partículas de nanohidroxiapatita poseen una alta capacidad de absorción de agua siendo capaces de absorber las moléculas de agua que penetran, reduciendo por tanto la hidrólisis de las cadenas macromoleculares. Por otro lado, debido a su carácter alcalino, pudieron neutralizar los productos de la degradación (monómeros), disminuyendo claramente la degradación autocatalítica del polímero [180].

Hay que tener en cuenta que la interfaz PLLA-nanopartícula suelta aumenta el área superficial de polímero expuesta al PBS, lo que puede también contribuir a una mayor absorción de agua [169]. Como se observó en las imágenes de SEM, los andamios con mayor porcentaje de hidroxiapatita, presentaron un menor tamaño de poro, las partículas impidieron la formación de poros de

tamaño grande. Esto podría deberse a la dificultad en el proceso de cristalización anterior a la sublimación.

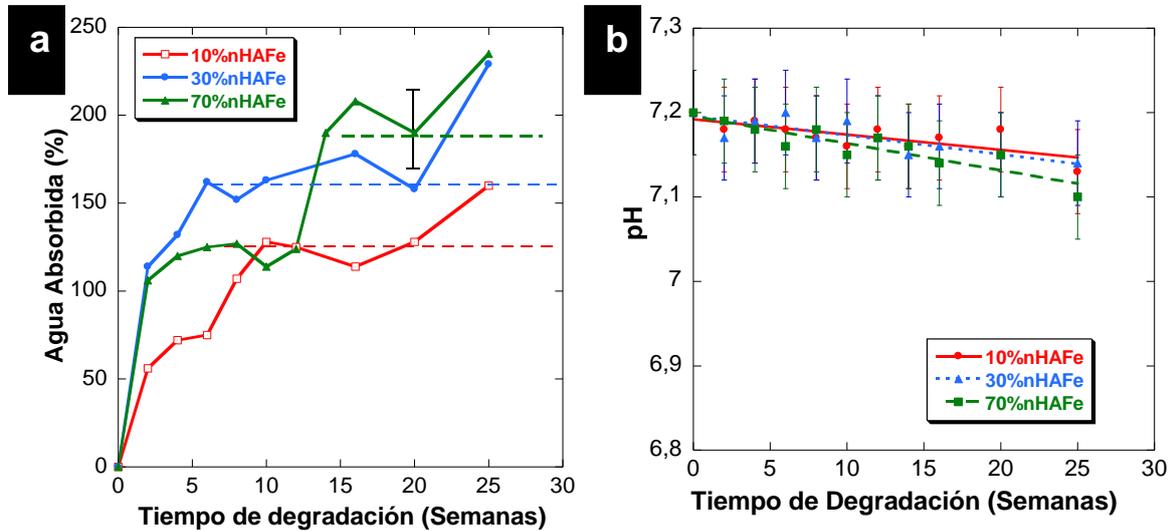


Figura 5.8.- (a) Absorción de agua, por los andamios de PLLA-nHAFc, en función del tiempo de degradación (b) Variación del pH de la solución tampón fosfato frente al tiempo de degradación

5.1.6.- Variación del pH

En este apartado, estudiamos los cambios de pH en la solución de PBS con el tiempo de degradación, lo cual nos indica el nivel de liberación de los residuos ácidos en este sistema PLLA-nHAFc, una mayor formación de estos productos ocasionan la disminución del pH del medio acuoso.

El comportamiento de degradación de los polímeros está influenciado por las partículas añadidas en los andamios porosos. La adición de partículas de hidroxiapatita en el andamio PLLA ralentiza la disminución del pH y reduce significativamente la pérdida de peso [184].

La Figura 5.8 (b) mostró la curva de variación del valor de pH de la solución de PBS con el tiempo de degradación. Se demostró que durante el tiempo de incubación, después de 25 semanas, la disminución en el valor del pH fue lenta y básicamente se mantuvo prácticamente inalterable entre 7.2-7.1 [183].

La mayor variación en el pH la experimentó la composición con un 70% nHAFé, esta disminución fue acompañada por una mayor absorción de agua como vimos en el apartado anterior.

Se puede suponer que la disolución de nHAFé libera iones PO_4^{3-} en la solución tampón circundante. Los iones PO_4^{3-} pueden unirse a los iones hidrógeno de la solución y actuar así como un álcali. Se cree que esto neutraliza los productos de degradación ácidos del poli- α -hidroxiácidos, estabilizando así el pH de la solución tampón [160, 215-217].

5.1.7.- Pérdida de masa y peso molecular

La técnica GPC se utiliza para medir el peso molecular de los materiales solubles. La primera consecuencia que se produce durante la degradación, es la disminución del peso molecular, seguido por una reducción de la resistencia a la tracción y por último se produce la disminución de masa [145].

La medición del peso molecular es una de las pruebas más importantes para estudiar la degradación *in vitro* del polímero, ya que la disminución del peso molecular es lo que primero vamos a poder observar en un tiempo relativamente corto [145].

A partir de los datos obtenidos por GPC en los andamios de PLLA-nHAFé (Tabla 5.3), pudimos analizar el efecto del tiempo de degradación sobre el M_w , M_n y el índice de polidispersidad hasta 25 semanas.

Aunque, se observaron cambios en el peso molecular con el tiempo de degradación, la pérdida de masa de estos andamios fue inferior al 5%, debido a que las cadenas permanecen atrapadas en las regiones cristalinas. La alta cristalinidad de nuestros soportes porosos también obstaculizó la incorporación de cadenas degradadas en los cristales, como suele ocurrir en andamios con cristalinidad inferior [190].

Este comportamiento puede ser explicado, porque durante la primera etapa del proceso de hidrólisis, la solución acuosa penetra en el polímero, iniciando la degradación hidrolítica, principalmente en las regiones amorfas [190, 218, 219]. En esta etapa, se observa una rápida disminución del peso molecular pero sin

pérdida de masa significativa porque las moléculas rotas todavía no son solubles en agua y permanecen dentro de la muestra. En la segunda etapa, la pérdida de masa aumenta, y la formación de monómero de ácido láctico se observa con un ligero cambio en el peso molecular. En este momento, las cadenas poliméricas largas se convierten en fragmentos más cortos solubles en agua que se disuelven en el medio; el PLA se convierte en soluble en agua cuando tiene un peso molecular medio numérico (M_n) <20.000 g / mol en la semana 25 de degradación [190].

Después de observar detenidamente los resultados de la Tabla 4.3, podríamos pensar que nuestro proceso degradativo se encuentra al final de la primera fase (no ha habido casi pérdida de masa $<5\%$). En las composiciones con 30 y 70%nHAFe correspondientes al final de la degradación (25 semanas), aparece un segundo pico a mayor tiempo de retención (*) que correspondería a cadenas de menor tamaño, siendo una señal clara e inequívoca del proceso degradativo, con $M_n < 20.000$ g/mol. Es evidente que no se ha alcanzado ni pérdida importante de peso en las muestras ni disminución considerable de la T_g [145].

En la semana 25 de degradación, se observó una disminución marcada $\sim 50\%$ en los valores de M_w y M_n para la composición de menor contenido de nanopartículas. Curiosamente, las otras dos composiciones, donde se observa la aparición de un segundo pico (*) la disminución fue inexistente (70%nHAFe) o mucho menor $\sim 25\%$ (30%nHAFe),

El peso molecular promedio en peso, M_w , del PLLA debe ser mayor a 50.000 g/mol para que sea factible su aplicación en dispositivos de fijación ósea [213, 220], todos los andamios sintetizados cumplen este requisito, como se puede ver en la Tabla 5.4 [213].

Para terminar, la observación/caracterización de las muestras de andamios de 10% y 30%nHAFe *in vitro* no mostraron indicios visuales de degradación durante la hidrólisis (Figura 5.9), que observan otros investigadores [160]. Únicamente para las muestras con una composición del 70%nHAFe, se desprendió parte del material, dando muestras de la fragilidad de este material, incluso antes de someterla al proceso de degradación hidrolítico.

Tabla 5.3.- M_w , M_n , e I del Sistema PLLA-nHAFé .

Muestra	Tiempo de degradación			
	(semanas)	M_w	M_n	I
PLLA	0	144221	104042	1.386
PLLA-10%nHAFé	0	98633	55206	1.787
	16	94867	53228	1.782
	20	92094	53123	1.734
	25	52704	32946	1.600
PLLA-30%nHAFé	0	66625	47961	1.389
	5	55750	30984	1.799
	16	49382	20093	2.458
	20	89927	45269	1.986
	25	49972	36484	1.370
	(*)	10668	9873	1.081
PLLA-70%nHAFé	0	81855	44573	1.836
	15	98065	45623	2.149
	25	86760	53289	1.628
	(*)	10982	10511	1.045



Figura 5.9.- Fotografía de PLLA-10%nHAFé (a) sin degradar y (b) 25 semanas degradado en PBS.

5.2.- SISTEMA PLLA-nFe₃O₄. ESTUDIO DE DEGRADACIÓN *IN VITRO*.

En este apartado vamos a estudiar la degradación *in vitro* de los andamios de PLLA-nFe₃O₄ en un amplio rango de composiciones: PLLA-10%nFe₃O₄, PLLA-30%nFe₃O₄, PLLA-50%nFe₃O₄ y PLLA-70%nFe₃O₄.

Varios trabajos han estudiado el papel fundamental de las nanopartículas magnéticas (NPMs) incorporadas dentro de los biomateriales; sugiriendo que las NPMs son una especie de dominio magnético único en la nanoescala y que el efecto del magnetismo generado a nanoescala puede fortalecerse con el aumento del contenido de NPMs [221]. Por este motivo, hemos fabricado andamios con un contenido de hasta el 70% de nanomagnetita con respecto del total de la masa del polímero (30%PLLA-70%nFe₃O₄).

Otros investigadores fabricaron andamios de PLLA con un porcentaje mucho menor de nFe₃O₄ (5%, 10% y 15% (w/w)) [175, 222]. Sin embargo, no han sido estudiadas con anterioridad concentraciones del 30-70% de magnetita en esta matriz polimérica, ni se han realizado ensayos de degradación *in vitro* sobre estas composiciones.

5.2.1.-Estudio de la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las distintas composiciones de composites de PLLA-nFe₃O₄ se muestra en las micrografías de la Figura 5.10. Estos andamios mantienen una estructura interna de poros tubulares abiertos de tipo escalera similares a los andamios PLLA puro, una morfología típica formada por separación de fases sólido-líquido (Figura 5.10) [128, 193], mostrando una estructura continua de poros interconectados. Las paredes de los poros están compuestas por PLLA y partículas de nFe₃O₄, que se encuentran homogéneamente distribuidas en la matriz polimérica de PLLA.

Muchas de las características importantes se pueden observar cualitativamente a partir de estas imágenes. En primer lugar, las comparaciones entre las distintas composiciones (figura 5.10 (a), (c), (e)) viendo el efecto que tiene la cantidad de nanopartículas añadidas al polímero. Por otro lado la evolución o

cambios experimentados durante el proceso degradativo (Figura 5.10 (b), (d) y (f) en las diferentes muestras.

Las vistas de los andamios a baja ampliación revelan la anisotropía de los poros y la presencia de defectos dentro de la estructura (Figura 5.10 (d), (f)). Estos defectos se deben a la solidificación de la mezcla y a las burbujas de aire atrapadas. Los moldes de las láminas de aluminio son muy conductores, por lo que la solidificación de la mezcla comienza en las paredes del molde creando cavidades hacia el interior. Un PLLA% en peso inferior con respecto al %volumen de disolvente produce andamios con defectos más grandes y mayores que aquellos con alto PLLA%p/v%. Pero por otro lado, al aumentar el porcentaje de polímero disminuye el porcentaje de porosidad, y esto no interesa. Una posible mejora de los resultados, se podría obtener utilizando moldes de teflón en lugar de aluminio para la fabricación de soportes porosos con una morfología con menor cantidad de defectos [169].

Como se puede observar en las figuras 5.10(a), (c) y (e) la adición de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ aumenta ligeramente el tamaño medio de los poros, siendo 60, 70 y 80 μm , para las composiciones 30, 50 y 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ respectivamente. La introducción de partículas de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ perturba la cristalización del disolvente y modifica el patrón de crecimiento de cristales haciéndolos más irregulares [129, 191, 193]. El resultado es una estructura más irregular e isotrópica y con poros más pequeños para estos andamios, si los comparamos con andamios de PLLA puro con un diámetro medio 100 μm , provocando engrosamiento de las paredes.

Los andamios de PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ presentan tamaños de poro irregulares siendo los poros más pequeños de $\sim 30 \mu\text{m}$; mientras que los poros de mayor tamaño varían según la composición, siendo más pequeños (120 μm) para la composición del 30% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, mayor para la composición 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (180 μm), presentan una estructura cerrada que tiene una característica anisotropía altamente tubular, debido al gradiente de temperatura siendo los canales paralelos a la dirección de cristalización del disolvente (dirección de la transferencia de calor) [128].

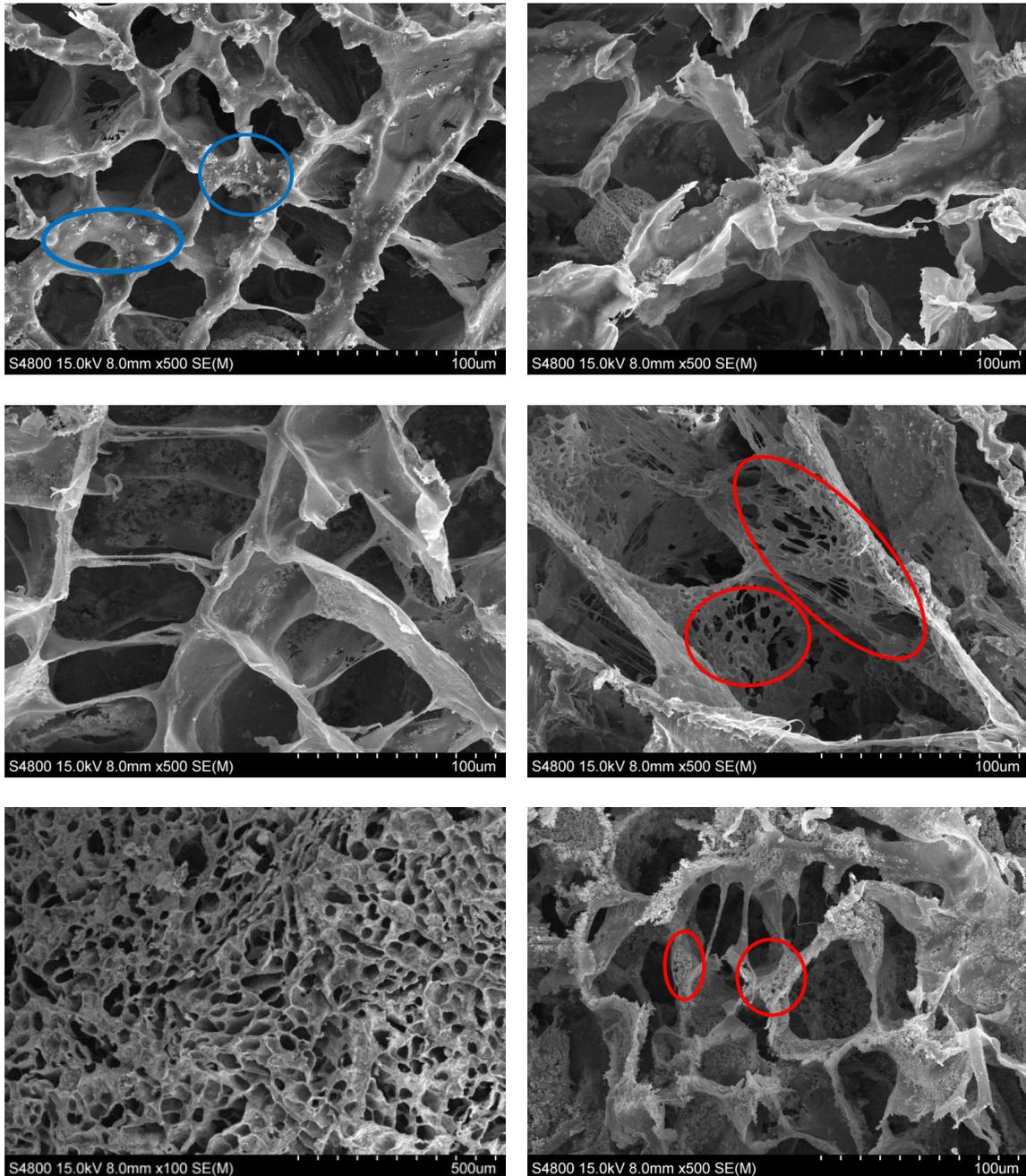


Figura 5.10.- (a) PLLA30%*n*Fe₃O₄ 8sd (X500), (b) PLLA30%*n*Fe₃O₄ 25sd, (c) PLLA50%*n*Fe₃O₄ 8sd (X500), (d) PLLA50%*n*Fe₃O₄ 25sd, (e) PLLA70%*n*Fe₃O₄ 8sd (X100) (f) PLLA70%*n*Fe₃O₄ 25sd

Las nanopartículas se distribuyeron dentro de las paredes de los poros de los andamios y no aparecieron grandes agregados en los poros, se encontraron homogéneamente distribuidas en la matriz de PLLA. Algunas fueron incorporadas en la pared del poro y otras fueron apiladas juntas entre poros o en los poros, al aumentar la proporción de nanopartículas se incrementa la

cantidad de partículas apiladas (círculos azules) y la textura superficial de la pared del poro se hace menos lisa.

La estructura interna de los poros original se mantenía básicamente en todas las muestras donde los poros grandes y medianos se podían observar claramente (Fig. 5.10 (b), (d) y (f)), después de 25 semanas. Sin embargo, se encontró un ligero aumento del tamaño de los poros, lo que hizo que la morfología de la superficie fuera más gruesa en contraste con la morfología original. A alta ampliación, se observó una estructura muy porosa con la fusión de pequeños poros [130].

En las composiciones de 50% y 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ aparecen a partir de la semana 16, gran cantidad de microporos en las paredes de la matriz polimérica (círculos rojos). La matriz polimérica de la composición 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ tenía un aspecto similar al algodón.

A través de las micrografías, se puede concluir que la degradación no se produce de forma homogénea en toda la muestra.

5.2.2.- Caracterización de la estructura química y análisis del proceso degradativo por Espectroscopia Infrarroja, FTIR

En la Figura 5.11 se recogen además de las bandas del PLLA puro, PLLA-70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ y de la $n\text{Fe}_3\text{O}_4$. Observamos como varían ligeramente de posición alguna de las bandas, como ocurrió en el apartado 5.1.2, lo que indica que existe interacción entre las nanopartículas y el polímero.

Los espectros de los andamios PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ muestran bandas típicas del polímero ligeramente desplazadas a aprox. 1.754 (estiramiento C=O) en forma de hombro, 1263 (flexión C=O), 1186 (estiramiento -C-O-) y 1.087 (tensión -C-O-) [207]. La primera banda podría estar relacionado con las vibraciones de estiramiento ($\nu_{\text{C=O}}$) de los grupos carbonilo del PLLA, interactuando con los cationes de hierro de la superficie de la $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, produciéndose el desplazamiento de esta banda situada a 1.748 cm^{-1} en el PLLA puro. [84, 139, 207].

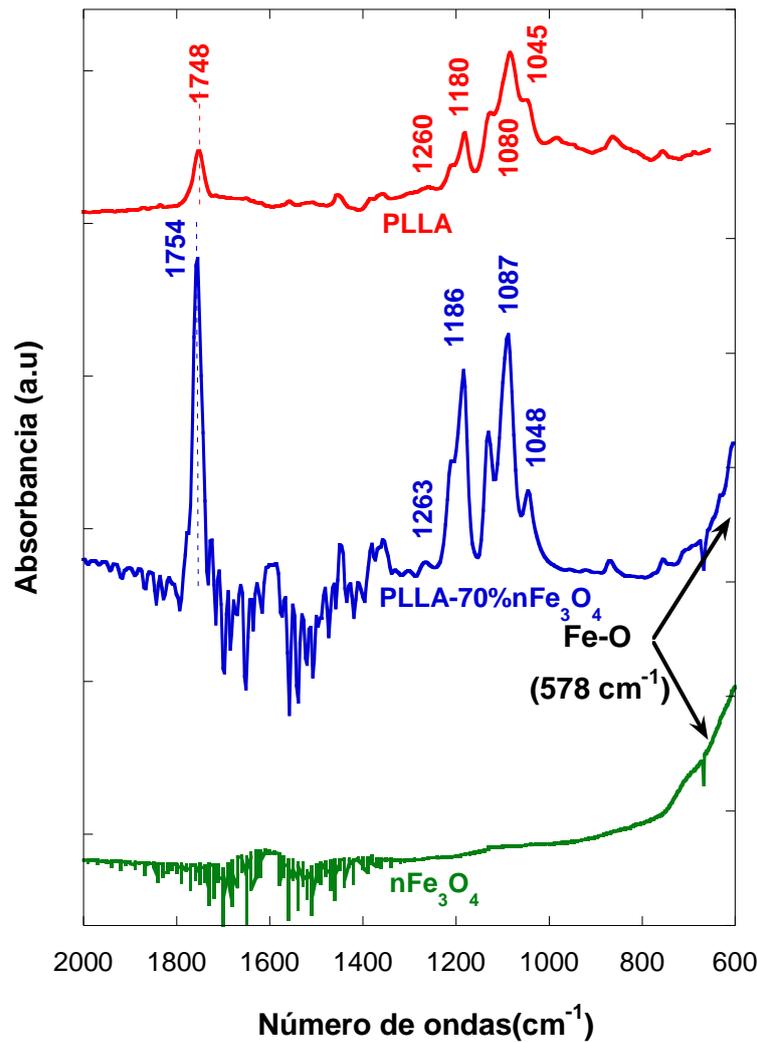


Figura 5.11.-Espectro FTIR de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, $\text{PLLA-70}\%n\text{Fe}_3\text{O}_4$ y de PLLA

La estructura de enlace químico de los andamios $\text{PLLA-n Fe}_3\text{O}_4$, como reveló el espectro FT-IR (Figura 5.11), mostró además de las bandas típicas relacionadas con PLLA, una banda distintiva a 578 cm^{-1} asignada a la vibración del enlace Fe-O de MNPs, que no podemos ver en su totalidad pero si la podemos intuir $\sim 600\text{ cm}^{-1}$ [223, 224]. Esta banda se volvió más nítida en los andamios $\text{PLLA-nFe}_3\text{O}_4$ con mayor contenido de MNP.

Por último, estudiaremos en este sistema, el proceso de degradación *in vitro* en PBS durante 25 semanas de incubación, Figura 5.12 (a) y (b). No pudo observarse un cambio consistente en la banda situada a 1754 cm^{-1} , debido a la saturación de la misma. No obstante si nos centramos en la banda $\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a finales carboxílicos, debería aparecer en el transcurso de la

degradación; pero no aparece [209]. Por tanto, no existen indicios de degradación en este sistema durante el periodo de incubación *in vitro* estudiado.

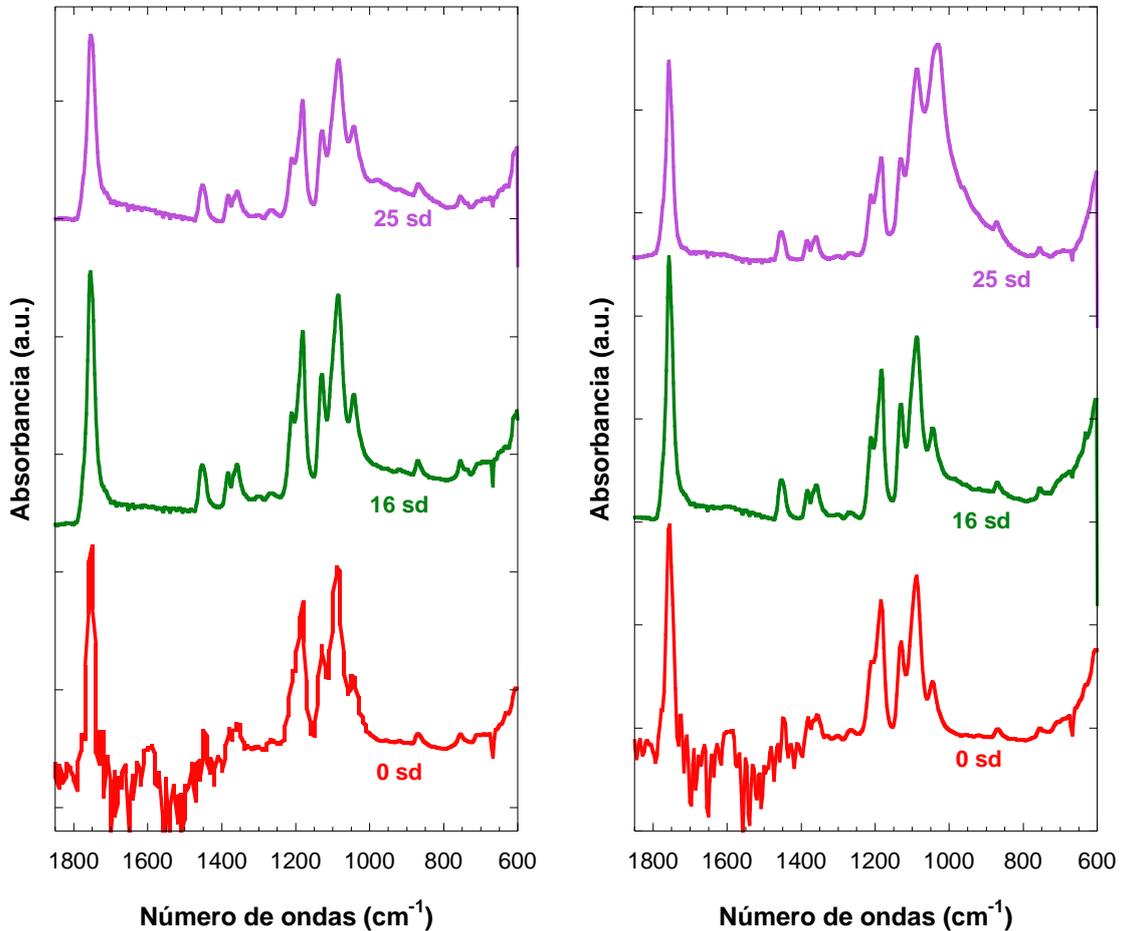


Figura 5.12.- Espectro (FTIR) de PLLA-30% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (a) y PLLA-70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (b) 0, 16 y 25 sd

5.2.3.- Análisis Térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En este estudio, hemos realizado un análisis de las propiedades térmicas del material de partida del sistema PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ y la evolución en función del tiempo de degradación *in vitro*, con la finalidad de comprender como las características y propiedades del sistema están siendo afectadas. Se recogen en la Tabla 5.4 las propiedades térmicas del sistema.

Tabla 5.4.- Propiedades térmicas del sistema PLLA-nFe₃O₄:

PLLA/ %nFe ₃ O ₄ t _{deg} (sem)	1 ^{er} Barrido				2 ^o Barrido			X _c % ^a	CF% ^b	X _{cc} % ^c
	T _{m1} (°C)	ΔH _{m1} (J/g)	T _{cc} (°C)	ΔH _{cc} (J/g)	T _g (°C)	T _c (°C)	ΔH _c (J/g)			
0% 0sd	184	41.1	76	4.7	56	96	2.3	39	6	39
10% 0sd	183	37.9	76	4	57.5	96	4.1	36	11	40.5
4sd	180	38.6	85.5	4.0	57	98.5	12.5	37	32	37
8sd	180	43.5	85	6.9	58	96	4.2	39	10	44
14sd	182	39.8			57	96	4.6	43	12	47.5
20sd	180	40.3	72.5	4.1	58.5	98	4.8	39	12	43
20% 0sd	183	37.1		3.9	59	102	19.7	36	53	45
30% 0sd	184	35.5	76.5	1.8	61	103	19.3	36	54	52
4sd	183	35.6	76.5	2.4	59	101	14.5	36	41	51
8sd	183	36.5	77	1.3	58.5	102	17	38	47	54
12sd	183	37.9			58	100	8.7	41	23	58
16sd	183	37.5			59	100	6.9	40	18	57
20sd	183	37.9			60	98	4.6	41	12	58
25sd	182	40			62	100	7.6	43	19	61
50%0sd	183	19.9	76.4	2.5	63	118	14.6	19	73	37
4sd	182	21.4			59	104	9.7	23	45	46
8sd	182	19.1			58	101	7.6	21	40	41
25sd	180	16.6	80	0.7	59	100	5.3	17	32	34
70%0sd	183	11.7	72	1.2	62	112	6.8	11	58	38
4sd	182	11.1	72	0.5	58	104	4.8	11	43	38
8sd	183	10.2	75	0.7	57	112	4.3	10	42	34
12sd	183	9			59	106	3.5	10	39	32
16sd	182	9.1			50	102	2.7	10	30	33
20sd	182	9	75	1.1	58	102	2.6	9	29	28
25sd	181	9			57	103	3.2	10	36	32

(a) $X_c \% = 100((\Delta H_{m1} \Delta H_{cc}) / \Delta H_m^0)$; $\Delta H_m^0 = 93 \text{ J/g}$ [153] [Fhiser 1993]. (b) $CF \% = 100(\Delta H_c / \Delta H_{m1})$. (c) $X_{corr} \% = 100(\Delta H_{m1} / W_{PLLA} \Delta H_m^0)$; W_{PLLA} fracción de polímero.

El estudio de la región de transición vítrea a partir de la técnica calorimétrica permite analizar el efecto de la degradación sobre las cadenas moleculares amorfas. En la primera exploración calorimétrica (Figura 5.13) se observa un fenómeno endotérmico, se observa la relajación estructural, superpuesta a la relajación de la transición vítrea. La temperatura de transición vítrea (T_g) se obtiene a partir del segundo barrido.

Muestras sin degradar

El primer y segundo barrido de estos andamios, se representan en la Figura 5.13 (a).

Se aprecia que el pico de fusión no presenta mayores cambios en su forma y posición para composiciones con un contenido de nanopartículas menor del

50%, lo que indica que no han sucedido mayores cambios en su estructura cristalina. Para las composiciones del 50 y 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, observamos que aunque el valor de T_m permanece invariable, $\sim 183^\circ\text{C}$, se reduce el tamaño del pico de fusión considerablemente, es decir, disminuyó para estas dos composiciones el valor de ΔH_m hasta un valor de 19.9 y 11.7 J/g, teniendo en cuenta que para el polímero puro presentó un valor de 41.1 J/g.

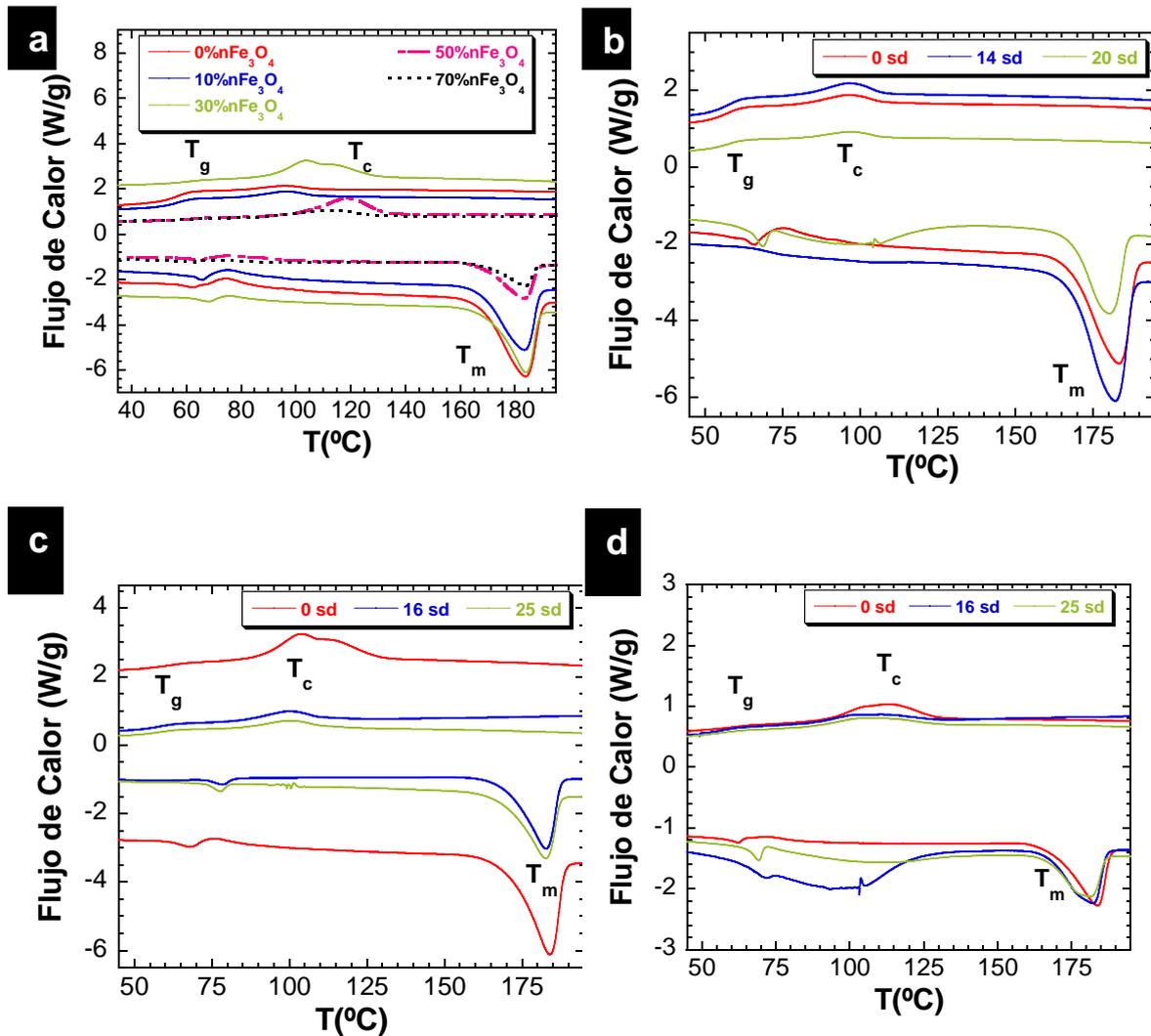


Figura 5.13.- Termogramas (a) PLLA con 0, 10, 30, 50 y 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, (b) PLLA-10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ 0, 16 y 25 sd, (c) PLLA-30% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ 0, 16 y 25 sd, (d) PLLA-70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ 0, 16 y 25 sd

La temperatura de cristalización (T_c) de los andamios con 20, 30, 50 y 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ aumentó (102, 103, 118, 112 $^\circ\text{C}$ respectivamente) con respecto a la del polímero puro y la composición con un 10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ (PLLA) (96 $^\circ\text{C}$). Es decir,

los soportes porosos PLLA empezó a cristalizar más lentamente que en el PLLA puro y la composición 10% n Fe₃O₄ (96°C). Este fenómeno sugiere que la presencia de partículas de n Fe₃O₄ no actúan como agente de nucleación sobre la cristalización de PLLA, disminuyó la cristalinidad ($X_c\%$) de un ~39% en el polímero puro a un valor del 11% en el andamio con mayor cantidad de nanopartículas, modifican el polímero haciendo disminuir drásticamente el grado de cristalinidad del PLLA, dificultando la cristalización y reduciendo la movilidad de las cadenas [170, 171].

El valor de la capacidad de cristalización de un polímero ($CF\%$) aumentó considerablemente con la adición de nanopartículas, desde el 6% para el polímero puro hasta ~73% en la composición del 50% de n Fe₃O₄. El $CF\%$ está relacionado con la longitud de las cadenas poliméricas. Si la longitud de la cadena polimérica se reduce por la adición de nanopartículas, cristalizarán más fácilmente en el segundo barrido las cadenas más cortas, aumentando el valor de $CF\%$ y disminuyendo la cristalinidad [138].

Las partículas, actúan como restricciones físicas reduciendo la movilidad de las cadenas del polímero, produciéndose un aumento de la T_c y un ligero aumento del valor de T_g de 56°C en el PLLA puro a 63°C para contenidos del 50% n Fe₃O₄.

La adición de hasta un 10% n Fe₃O₄ no tiene un efecto significativo sobre sus temperaturas características: T_g , T_m , T_c [169]. Para cantidades superiores de nanopartículas T_g y T_c experimentan una gran variación.

En resumen, las muestras con mayor contenido de nanopartículas disponen de menor cristalinidad y entalpías de fusión. Esto se debe al aumento de la rigidez de las cadenas poliméricas, verificándose tanto en el porcentaje de cristalinidad, como en la temperatura de transición vítrea.

Muestras degradadas en PBS

La prueba DSC en este estudio se utilizó para buscar la temperatura de transición vítrea, T_g , y los cambios de la misma durante la degradación. De forma similar a la temperatura de fusión, que se denomina T_m y depende del peso molecular del polímero, la T_g disminuye debido a la reducción del peso

molecular. Durante la degradación, las cadenas largas de la molécula se rompen en otras más cortas dando como resultado una reducción del peso molecular [145, 225], como comprobaremos en el ensayo de GPC.

Para las composiciones de 10 y 30% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, T_g se desplazó a temperaturas más altas y T_m disminuyó. Después de 25 semanas de degradación, esto puede atribuirse a una menor movilidad de las cadenas de polímero PLLA debido a la presencia de dominios cristalinos. [184, 226, 227]. Las cadenas principales parcialmente degradadas de PLLA puede ser el factor principal para esos cambios de temperatura característicos [228]. La cristalinidad de estas dos composiciones (10 y 30% de nanopartículas) aumentó cosa que no ocurrió en el resto de composiciones, que disminuyó.

El pico de fusión se desplazó a temperaturas ligeramente menores en todas las composiciones, a medida que aumenta el tiempo de degradación, esto está asociado a un menor espesor de la lamela (Figura 5.13 (b), (c) y (d)) [157].

5.2.4.- Propiedades Magnéticas

Las propiedades magnéticas de los compuestos PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ desarrollados en este estudio fueron explorados utilizando un magnetómetro de muestra vibrante VSM a 37°C.

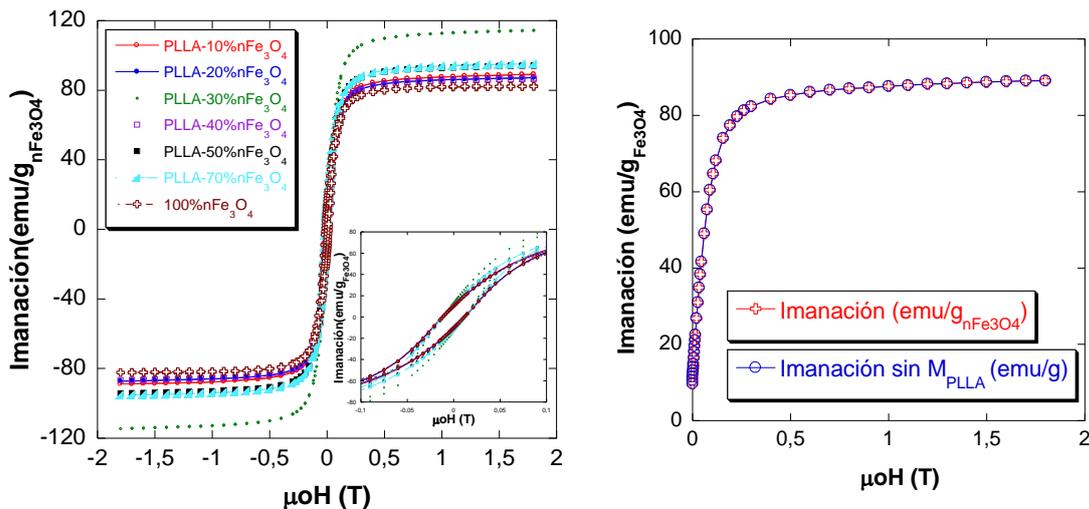


Figura 5.14.- (a) Curvas de imanación obtenidas para $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ y de los andamios de PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, detalle de ciclo de histéresis ampliado y (b) Curva $M(H)$ del compuesto PLLA-10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ en rojo y en azul eliminando la aportación diamagnética del PLLA.

La Figura 5.14 (a) muestra las curvas de imanación de los andamios de PLLA-nFe₃O₄ preparados, normalizadas al contenido de nFe₃O₄. Los parámetros magnéticos imanación de saturación a 1,5%T, el campo coercitivo y el contenido real de nanopartículas, se presentan en la Tabla 5.5. El campo coercitivo tanto para la nanopartículas como para los andamios magnéticos es muy similar y exhiben las diferentes composiciones un pequeño lazo de histéresis. El valor del campo coercitivo de las partículas de magnetita pura, ≈ 12 mT (≈ 120 G), era alto, como para que surja el SPM puro. La no fluctuación de la distancia media entre las partículas reflejado por la no fluctuación en el campo coercitivo, confirma la buena dispersión de los aglomerados de nanopartículas en la matriz polimérica.

El campo coercitivo, $\mu_0 H_c$, permaneció sustancialmente inalterado después de la adición al PLLA; 11,87 mT para las nanopartículas puras y de 12,05-11,62 mT para las nanopartículas en los andamios, respectivamente. Su valor es menor que el recogido habitualmente en la literatura para óxidos de hierro nanométricos entre 18 y 20mT [229].

Tabla 5.5.- Imanación, coercitividad, y contenido de nFe₃O₄ recalculado a partir de las medidas magnéticas

% nFe ₃ O ₄ Nominal	Imanación (Am ² /kg _{nFe3O4})	$\mu_0 H_c$ (mT)	%nFe ₃ O ₄ recalculada
100 ⁽¹⁾	82.05	11.87	—
10	88,70	12,05	10,8
20	86,85	11,75	21,2
30	114,04	11,75	41,7
40	86,30	11,67	42
50	94	11,62	57
70	94,82	11,83	80,5

⁽¹⁾nFe₃O₄ pura tomada como referencia.

Los ciclos de histéresis de los compuestos PLLA-nFe₃O₄ fabricados eran típicos de la histéresis ferromagnética (Figura 5.14 (a)). Esto se debe a que el

diámetro de las partículas de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ utilizadas en este estudio fue mayor de 30 nm, como ya estudiamos en el apartado 4.2.4. Por lo tanto, las partículas mayores de 30 nm muestran el comportamiento ferromagnético [176, 177, 230,231]. Además, el momento magnético de estos andamios aumentó linealmente con las mayores proporciones de partículas de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, de acuerdo con los resultados de otros investigadores y con nuestros resultados en el resto de sistemas estudiados [85, 230, 231].

Contribución Diamagnética de polímero:

La gráfica 5.14 (b) es el resultado de la eliminación de la contribución diamagnética del polímero PLLA. Vemos como es despreciable dicha contribución incluso para los composites con menor contenido de nanopartículas. No estando este resultado de acuerdo con otros investigadores donde observaban un fondo diamagnético atribuible al polímero [85].

5.2.5.- Absorción de agua

El comportamiento del índice de hinchamiento está influenciado por el grado de cristalinidad y el peso molecular de la muestra. Es decir, a mayor cristalinidad y mayor peso molecular, menor será el hinchamiento, ya que la difusión de la solución al interior del polímero se da más fácil a través de las zonas amorfas que de las zonas cristalinas. Es por esto que las muestras analizadas presentan un alto índice de hinchamiento.

Comparando las muestras analizadas, se encontró que el índice de hinchamiento aumenta al aumentar el porcentaje de nanopartículas, $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, debido a que ésta presentó menor cristalinidad (Tabla 5.4) y se espera que también tenga menor peso molecular inicial (Tabla 5.6), lo que facilita una mayor difusión de la solución al interior del polímero al tener mayor proporción de parte amorfa [213].

La Figura 5.15 (a) mostró que a lo largo del tiempo de degradación, la absorción de agua de las diferentes muestras se incrementó drásticamente en la semana 4 de incubación, superando el 100% de agua absorbida únicamente

la composición con mayor cantidad de nanopartículas (70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$). Suavizando posteriormente el aumento de agua absorbida. Todos los andamios absorbieron una cantidad de agua menor que la observada en los anteriores sistemas. Alcanzaron el máximo de absorción al final del periodo de incubación las composiciones con 30 y 70% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$.

Es obvio, que al aumentar la cantidad de $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ en el PLLA se incrementa la absorción de agua, siendo los andamios con 10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ de PLLA los que mostraron menor absorción a lo largo del periodo de incubación, no llegando a alcanzar el valor alcanzado en la semana 4 (valor máximo) al final de las 25 semanas de degradación *in vitro*. [22].

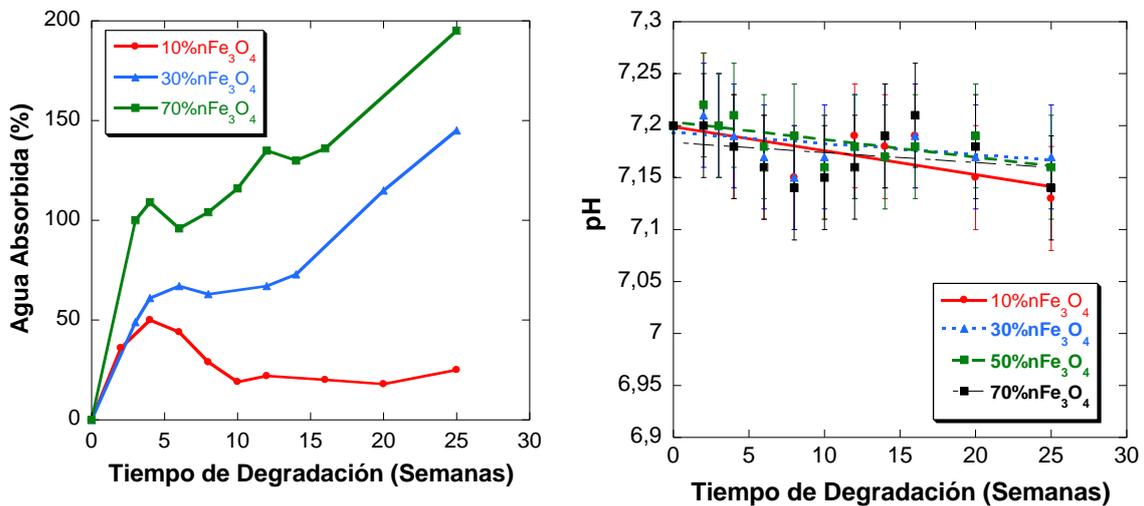


Figura 5.15.- (a) Absorción de agua, por los andamios de PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, en función del tiempo de degradación (b) Variación del pH de la solución tampón fosfato frente al tiempo de degradación

5.2.6.- Variación del pH

En este apartado, mediremos cual ha sido el nivel de liberación de residuos ácidos en la solución de PBS durante las 25 semanas de incubación, midiendo la variación de pH.

La Figura 5.15 (b) mostró la curva de variación del pH para el sistema PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$, hubo una disminución lineal mínima en el valor del pH entre 7.22-7.13

(<2%) [183]. La estabilización del pH se debió a la neutralización de las nanopartículas de los productos de degradación ácidos de este poli- α -hidroxiácidos. La mayor variación en el pH la experimentó la composición con un 10% n Fe₃O₄, esta disminución fue acompañada por una menor absorción de agua, justificable por la menor cantidad de nanopartículas hidrófilas y con carácter básico.

5.2.7.- Pérdida de masa y peso molecular

En un proceso típico de degradación del PLLA, el peso de las muestras podría mantenerse en una primera etapa, seguido de una pérdida aguda. Es fácil detectar una fuerte pérdida de peso para este polímero que nos indicaría el avance de la degradación [117, 130, 232].

Nuestros soportes porosos, no han experimentado pérdida de peso superior al 3%, señal de que no ha habido apenas degradación a lo largo del periodo de incubación de 25 semanas en PBS.

La pérdida de peso permanecieron inalterables, pero el peso molecular si experimentó un decremento que se recoge en la Tabla 5.5.

Se observó un ligero aumento en el peso molecular después de 18 semanas en la composición con un 50% n Fe₃O₄ debido a reordenamientos en las cadenas macromoleculares.

En las distintas composiciones, el peso molecular disminuye en la semana 25 y cae especialmente en las composiciones con un 10 y 50% n Fe₃O₄, alcanzando una reducción del ~40% y 50% del peso molecular inicial respectivamente

Se generó una fracción mayor de cadenas cortas con el tiempo de degradación, y la masa molar media en peso disminuyó. El índice de polidispersidad aumentó ligeramente a medida que las masas moleculares decrecieron [190].

La evolución de las propiedades presentadas en este estudio sugiere que el polímero estaba en su primera etapa de degradación, al menos durante las 25 semanas de este experimento. No hubo signos de transición hacia la segunda

etapa de degradación, como lo indican que no se produjo cambios morfológicos ni de masa [190].

Observamos, que al aumentar la cantidad de nanopartículas en el andamio, los valores tanto de M_w como de M_n disminuyeron con respecto al PLLA puro.

En esta Tabla 5.5 se recogen los pesos moleculares de los andamios de PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ resultando ser mayores de 50.000 g/mol, lo que hace factible su aplicación en dispositivos de fijación ósea [213, 220].

Tabla 5.5.- M_w , M_n , e I del sistema PLLA- $n\text{Fe}_3\text{O}_4$.

Muestra	Tiempo de degradación (semanas)	M_w	M_n	I
PLLA	0	144221	104042	1.386
PLLA-10% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$	0	86087	55270	1.558
	15	70655	36196	1.952
	25	51040	28757	1.775
PLLA-30% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$	0	62280	35695	1.745
	15	32867	22501	1.461
	25	50367	20911	2.409
PLLA-50% $n\text{Fe}_3\text{O}_4$	0	61018	33257	1.835
	14	39878	24554	1.624
	18	98439	50825	1.937
	25	31721	14722	2.155

Capítulo 6

Estudio Preliminar Biocompatibilidad in vitro. Citotoxicidad. Ensayo MTT

En este apartado vamos a cuantificar la citotoxicidad de los productos liberados en medio de cultivo (eluyentes) por alguno de nuestros soportes porosos, mediante la utilización del reactivo MTT [13]. El reactivo MTT se acumula en el interior de las células, ya que no es capaz de atravesar la membrana celular. Tras la adición de un disolvente, como el dimetilsulfóxido (DMSO), los cristales de formazán formados se disuelven, pudiendo cuantificar colorimétricamente la intensidad.

La viabilidad celular y la proliferación en cada grupo se evaluaron utilizando el ensayo de MTT a 24 y 72 horas. Mediante este ensayo se mide la función metabólica en las células a través de la actividad mitocondrial; donde una mayor absorbancia, significa un aumento de la proliferación celular o una mayor tasa de metabolismo. Una reducción en la actividad metabólica celular es una indicación temprana de daño celular, que podría conducir la muerte celular [233].

Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados en Braga (Portugal) por el equipo del Doctor Senentxu Lanceros-Méndez, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.1. Todos los compuestos estudiados muestran una viabilidad celular superior al 70%. Basándonos en las normas de la ISO 10993-5:2009. Esta viabilidad aumentó a las 72 horas en los andamios con nanopartículas magnéticas con PCL respecto al resultado obtenido a las 24 horas, mientras que en los andamios de PLLA disminuyó después de 24 horas.

Los andamios PCL-30%nHAFe, PCL-50%nHAFe y PCL-20%nFe₃O₄ superan el 200% de viabilidad a las 72 horas, presentando una gran biocompatibilidad.

En los ensayos in vitro, los soportes porosos del polímero PCL con nanopartículas magnéticas (nHAFé o nFe₃O₄) proporcionan un entorno favorable para la adhesión celular inicial, mantiene la viabilidad celular y la proliferación celular. Se observa que estas nanopartículas añadidas desempeñan un papel importante en la mejora de la biocompatibilidad de estos composites basados en PCL con respecto al PCL puro. Para confirmar el rendimiento práctico de estos se deberían realizar estudios de mayor duración (7-11días), para confirmar su uso como biomateriales, comprobando los resultados numéricos mediante la observación mediante SEM. Este ensayo podría estar proporcionando un falso positivo debido a la posible actividad reductora de alguno de los componentes de los andamios en el compuesto MTT, lo que podría conducir a una falsa viabilidad positiva, sin embargo este efecto no ha sido observado en estas nanopartículas, ni en ninguno de los dos polímeros por otros investigadores [233].

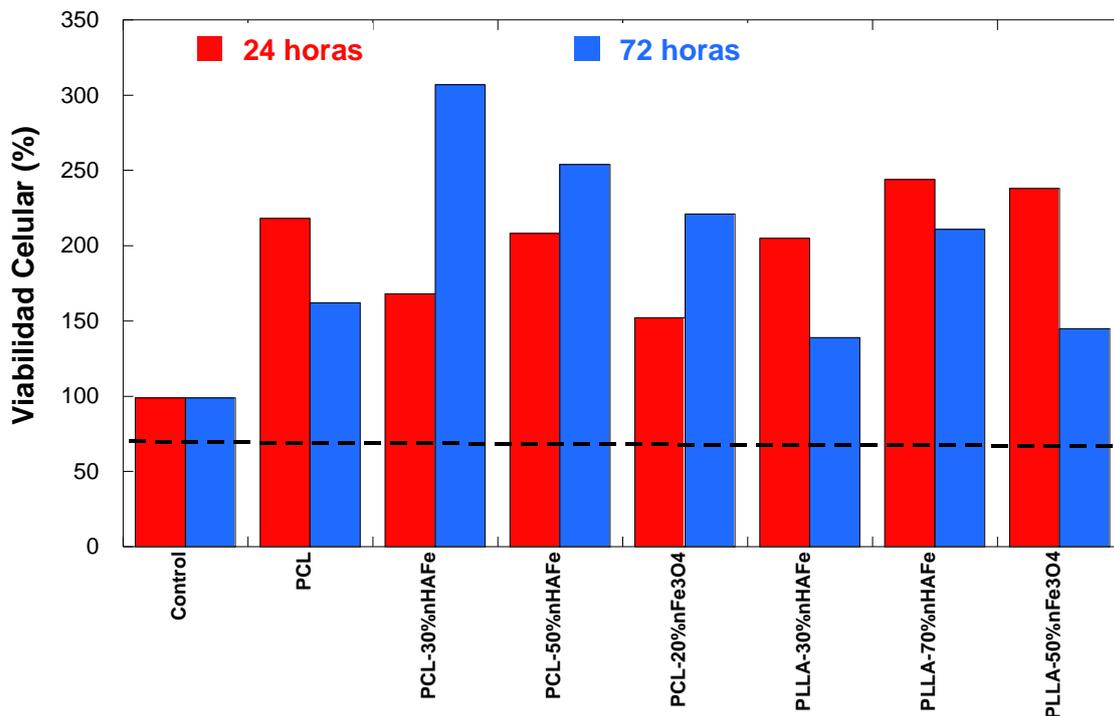


Figura 6.1.- Resultados del ensayo MTT de los andamio PCL, PCL-30%nHAFé, PCL-50%nHAFé, PCL-20%nFe₃O₄, PLLA-30%nHAFé, PLLA-70%nHAFé y PLLA-50%nFe₃O₄.

En el resto de andamios ensayados la proliferación celular disminuyó a las 72 horas. La viabilidad puede haberse reducido por un efecto citostático, o por un efecto antiproliferativo; estos dos efectos no deben definirse como citotoxicidad. El término de viabilidad debe ser una definición general que comprenda estos tres parámetros (efecto citotóxico, efecto citostático, efecto antiproliferativo). Por lo tanto, cualquier disminución en la viabilidad puede ser resultado de cualquiera de estos tres efectos. Por tanto, será recomendable alargar el periodo de estudio y comprobar mediante SEM el resultado de este ensayo. Las lecturas de absorbancia obtenidos excesivamente altos, deberían ratificarse disminuyendo la densidad celular en cada ensayo.

Capítulo 7

Conclusiones

A continuación se presentan las conclusiones obtenidas a lo largo del presente estudio:

- TIPS (*Thermally Induced Phase Separation*), demostró ser un método capaz de crear soportes altamente porosos con una estructura muy interconectada. Esta técnica de fabricación, demostró ser muy versátil en la creación de andamios porosos.
- Ambos polímeros (PCL y PLLA), fueron capaces de crear estructuras con gran porosidad e interconexión con las nanopartículas magnéticas empleadas en el presente estudio (nHAFé y Fe_3O_4), en un amplio rango de composiciones; que van desde el 10 al 80% de nanopartículas con respecto a la masa total del polímero.
- La elección del disolvente, 1,4-dioxano y el bajo porcentaje de polímero (2,5%) con respecto al volumen del disolvente, ayudaron en la obtención de buenos resultados con altas porosidades.
- Las partículas magnéticas elegidas pudieron ser dispersadas directamente en la solución polimérica mediante la acción combinada de ultrasonidos y agitador manual, permitiendo una gran reproductibilidad en las muestras junto con una buena dispersión de las nanopartículas en la matriz polimérica. La no variación del campo coercitivo obtenido por todos las muestras, mediante VSM, corroboran esta afirmación.
- Los ciclos de histéresis de los compuestos fabricados eran típicos de la histéresis ferromagnética, al igual que las nanopartículas utilizadas. En el caso de la n Fe_3O_4 , se justifica este comportamiento por el diámetro de las partículas utilizadas en este estudio mayor de 30 nm.

- Los pesos moleculares de los andamios fabricados resultaron ser mayores de 50.000 g/mol, lo que hace factible su aplicación en dispositivos de fijación ósea.
- La adición de nanopartículas modificó ligeramente la morfología de los soportes produciendo una ligera reducción en el tamaño de los poros manteniendo una alta porosidad. En cuanto al proceso de degradación los andamios con tamaño de poro más pequeño se degradan más lentamente que aquellos con poros más grandes.
- La caracterización FTIR de los andamios indicó que ambas nanopartículas no habían reaccionado con la PCL encontrándose dispersa en la matriz de PCL, no produciéndose desplazamiento de las bandas características con respecto al polímero puro. Por otro lado, esta técnica mostró un pequeño desplazamiento de las bandas de absorción fundamentales en los andamios de PLLA con respecto al polímero puro. A lo largo del periodo de degradación *in vitro* al que se sometieron los diferentes sistemas, no pudo observarse un cambio consistente en la banda del carbonilo, ni tampoco se aprecia la banda $\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a grupos finales carboxílicos, que debería aparecer en el transcurso de la degradación. Por tanto, no existen indicios de degradación en los distintos sistemas durante el periodo de incubación *in vitro* estudiado.
- La hidrofobicidad de la superficie de un andamio tiene un gran efecto en la respuesta celular. Las células exhiben una mayor adhesión y proliferación en una superficie hidrófila. Por este motivo en el diseño experimental de nuestros andamios, hemos pretendido funcionalizar la superficie aumentando la hidrofobicidad de nuestros andamios de PCL y PLLA; mediante la adición de nanopartículas (nHAFé y nFe₃O₄) con un fuerte carácter hidrofílico. Observándose los siguientes efectos:
 - ✓ Aumento de absorción de agua durante el periodo de degradación
 - ✓ Neutralización de los productos ácidos de la degradación hidrolítica, manteniendo prácticamente invariable el pH de la solución tamponada por su carácter básico.
 - ✓ Aparición de bandas anchas de absorción de grupos hidroxilos centradas $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ en los espectros IR debido al carácter

hidrofílico del sistema. Estas bandas indican la presencia de agua en el sistema pese al proceso de liofilización efectuado.

- ✓ Aumento del área superficial debida a la interfaz Polímero-nanopartículas aumenta el área superficial del polímero expuesta al PBS, lo que podría contribuir a una mayor absorción de agua.
 - ✓ Reducción del ratio de degradación actuando como una barrera física que impedía la entrada de agua al armazón polimérico, y neutralizando su acción autocatalítica, limitando la absorción de PBS y reduciendo la velocidad de degradación.
- Aunque se observaron cambios en el peso molecular con el tiempo de degradación, no se registró pérdida de masa, ya que las cadenas permanecen atrapadas en las regiones cristalinas debido a la alta cristalinidad de los andamios.
 - La mayor adición de nanopartículas hizo disminuir considerablemente la cristalinidad (X_c) y la entalpía de fusión (ΔH_m). Este fenómeno sugiere que en general las nanopartículas no actúan como agente de nucleación sobre la cristalización del polímero, modifican el polímero haciendo disminuir drásticamente el grado de cristalinidad ($X_c\%$), dificultando la cristalización y reduciendo la movilidad de las cadenas. Las partículas, actúan como restricciones físicas reduciendo la movilidad de las cadenas del polímero, produciéndose un aumento de la T_c y un ligero aumento del valor de T_g .
 - En el sistema PLLA-HAFe las composiciones con 30 y 70% nHAFe en la semana 25 de incubación, aparece en los resultados de GPC un segundo pico que correspondería a cadenas de menor tamaño, siendo una señal clara e inequívoca del proceso degradativo, con $M_n < 20.000\text{g/mol}$. No se alcanzó sin embargo, ni pérdida importante de peso en las muestras ni disminución considerable de la T_g .
 - Los soportes porosos de PCL estudiados muestran una viabilidad celular muy superior al 70%, aumentando a las 72 horas de incubación, podrían ser utilizados como biomateriales, de confirmarse los resultados obtenidos y presentar una gran biocompatibilidad debido a su alta actividad osteoblástica.

Apéndice 1

Métodos experimentales

MÉTODOS DE SÍNTESIS

-Separación de fases inducida térmicamente (TIPS). La separación de fases inducida térmicamente fue aplicada por primera vez en la fabricación de andamios por Schugens y colaboradores en 1996 [128, 191] Muchos investigadores han utilizado esta técnica obteniendo una porosidad de hasta el 95%.

El método consiste en inducir una separación de fases sólido-líquido o líquido-líquido. Para ello el polímero es disuelto en 1,4 dioxano y la separación de fases se induce reduciendo la temperatura de la solución polimérica. El templado induce la formación de una fase rica en polímero y otra muy pobre. Después el disolvente se extrae mediante liofilización u otra técnica de extracción. El espacio ocupado por el solvente se convertirá en los espacios o poros del soporte poroso.

Se han descrito diferentes mecanismos de separación de fases dependiendo de la proporción de volumen entre disolvente y polímero, su solubilidad, la temperatura de temple y la adición de agua en la solución polimérica. La separación líquido-líquido ocurre cuando la temperatura de temple es más alta que la temperatura de cristalización del disolvente, mientras que la separación sólido-líquido tiene lugar cuando la temperatura de cristalización del disolvente es más alta que la temperatura aplicada.

Las principales diferencias morfológicas entre los andamios del diseño experimental resultan de la diferencia de mecanismo de formación de esta morfología.

- La separación de *fases sólido-líquido*, controlada por la cristalización del dioxano, produce poros más grandes (debido a los canales de cristalización), pero menos interconectados, y por lo tanto una porosidad anisotrópica, es decir más orientada y distribuida, pero también más débil que los andamios fabricados por una separación líquido-líquido. Teóricamente los andamios fabricados de esta manera tienen una morfología tubular muy anisotrópica con una estructura interna similar a la de una escalera [128-131]. Las cavidades son paralelas a la dirección de solidificación y tienen particiones repetitivas. La progresión del frente de cristalización del solvente define la principal orientación de los poros, los ejes largos paralelos a la dirección de enfriamiento [128-130, 191].
- La separación de *fases líquido-líquido* ocurre cuando la temperatura de cristalización del solvente es más baja que la temperatura de separación de fases de una solución polimérica amorfa, La Figura 1 muestra un diagrama de equilibrio de fases de la solución polimérica.

Hay dos tipos de separación de fases líquido-líquido que pueden ocurrir cuando una solución polimérica homogénea se enfría:

- Entre las curvas binodal y espinodal del diagrama de fases, la separación de fases líquido-líquido se produce por un mecanismo de nucleación y crecimiento. La separación de fases no ocurre hasta que un núcleo de una de las fases que es lo suficientemente grande para ser inestable a un crecimiento adicional. La estructura obtenida es generalmente dispersa.
- Al contrario, debajo de la curva espinodal, la solución polimérica es propensa a una separación de fases líquido-líquido espontánea (descomposición espinodal) con la formación de un red interconectada de dos fases [128, 129].

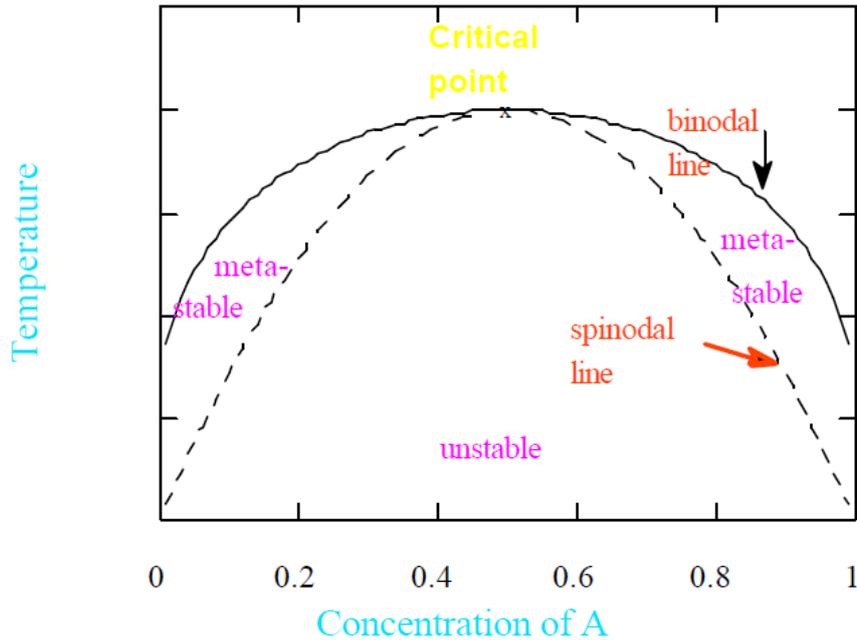


Figura 1.- Diagrama de fases temperatura-composición de una solución polimérica
www.poco.phy.cam.ac.uk/teaching/A_Donald/Phase_Diagrams.htm - 101k –

La liofilización es un proceso de deshidratación de productos a baja presión (vacío) y moderada temperatura. La clave está en que el disolvente se sublima. Por este motivo el producto debe permanecer obligatoriamente solidificado (congelado) durante todo el proceso.

El proceso de liofilización cuenta con tres etapas clave:

- a) Congelación inicial: Es una operación previa y obligatoria. El tiempo de duración depende de varios factores como la cantidad, concentración y naturaleza propia del producto
- b) Sublimación o desecación primaria: Es la etapa en la que el 95% del disolvente pasa a vapor. Durante esta fase la presión se baja a unos pocos milibares, y se aplica calor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados y no es posible modificar uno sin que sean afectados los otros. Un calor excesivo por ejemplo reducirá el tiempo de liofilización pero puede alterar la estructura del material, por lo que se suelen preferir tiempos más largos y este proceso suele durar días.

El liofilizador cuenta con un condensador capaz de alcanzar temperaturas inferiores a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y donde el vapor del solvente se resolidifica para impedir que llegue a la bomba de vacío. En estos rangos de presión el calor se transfiere principalmente por conducción o radiación y los efectos de convección son despreciables.



Figura 2.- Liofilizador Telstar Lioquest 85 utilizado para la obtención de soportes porosos magnéticos

c) Desorción o desecación secundaria: Su misión es eliminar las últimas trazas de vapor de disolvente, evaporando el que no está congelado. Para ello se eleva más la temperatura, pudiendo alcanzarse temperaturas por encima de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ pero siempre por debajo de la temperatura de desnaturalización del producto. Se trata de romper las interacciones físico-químicas formadas entre las moléculas del solvente y el material para facilitar su desorción.

MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN

- **La difracción de rayos X** se produce cuando un haz de energía similar al de la distancia interplanar de los átomos (del orden de los rayos X) interacciona con estructuras cristalinas generando así una dispersión elástica de ondas que están en fase e interaccionan de forma constructiva. La difracción solo se da en determinados ángulos de acuerdo con la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta \quad (1)$$

donde λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, θ es el ángulo que forman el haz incidente y los planos cristalinos, n es un número entero y d_{hkl} es la distancia entre planos cristalinos. El patrón de difracción depende de la estructura cristalina de la muestra y de los átomos que la forman.

Un difractómetro de rayos X está compuesto por una fuente de energía que suele ser un ánodo giratorio que produce un haz de rayos X de una determinada longitud de onda, un monocromador que se ocupa de aislar el haz de rayos X deseado, un colimador que se ocupa de alinear el haz de rayos X, un goniómetro giratorio que es donde se encuentra situado la muestra cristalina y que permite posicionar ésta en diferentes ángulos con respecto al haz y un detector que es el encargado de grabar o recoger el patrón de difracción. El equipo es calibrado previamente con un patrón de NaCl cuyos ángulos de difracción son perfectamente conocidos.

Si la red cristalina está libre de deformación y los cristales predominan de manera general en la muestra, entonces se puede estimar el tamaño promedio de cristal empleando la fórmula de Scherrer:

$$D = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2)$$

Donde:

D es el tamaño medio de los dominios ordenados (cristalinos), que puede ser menor o igual al tamaño del grano

K es un factor de forma adimensional, con un valor cercano a la unidad. El factor de forma tiene un valor típico de aproximadamente 0,9.

λ es la longitud de onda de la radiación utilizada (λ_{Cu}).

θ es el ángulo de difracción, posición del pico de difracción.

β es el ancho a la altura media del pico de difracción de la muestra (FWHM), después de sustraer el ensanchamiento de la línea instrumental, en radianes. Esta cantidad también se denomina a veces como $\Delta (2\theta)$.

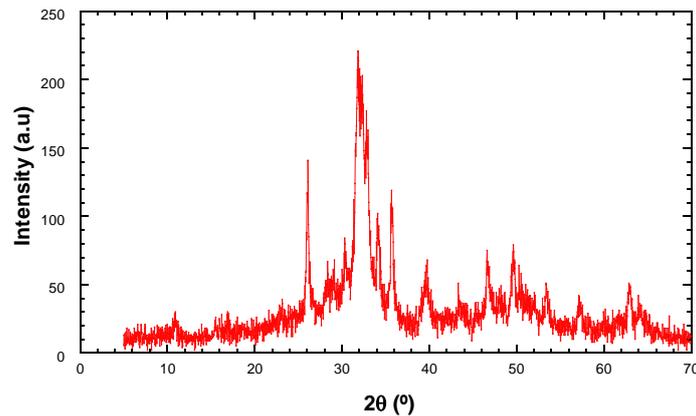


Figura 3. Difractograma de la nHAFé sintetizada.

- **La microscopía electrónica de transmisión.** EL microscopio electrónico de transmisión (TEM) se compone de un sistema de vacío, una pantalla donde se proyecta una imagen aumentada de la muestra y una cámara fotográfica o pantalla de ordenador que tienen la función de registrar la imagen. Dentro del sistema de vacío se encuentran un cañón que produce un haz de electrones y un sistema de lentes electromagnéticas. El esquema del microscopio electrónico se puede observar en la Figura 4.

Para la obtención de una imagen, el cañón electrónico produce un haz de electrones que es acelerado mediante una diferencia de potencial que puede oscilar entre 80 y 600 KeV dependiendo del modelo. El microscopio electrónico utiliza un fino haz de electrones acelerados que, al impactar con la muestra, genera una serie de señales directamente relacionadas con la estructura atómica del objeto investigado. Estas señales se seleccionan por separado para generar distintos tipos de imágenes y obtener datos analíticos. En el TEM los electrones transmitidos con y sin dispersión se utilizan para crear imágenes de transmisión convencionales, de campo oscuro y alta resolución, revelando la

estructura interna de las muestras, tamaño y distribución de partículas, su red cristalina, interfases y defectos puntuales de la red atómica, etc.

Los microscopios de transmisión tienen una capacidad de resolución de hasta 0.23 nanómetros entre puntos y 0.14 nanómetros entre líneas, lo que permite aplicarlo en el campo de la nanociencia y la nanotecnología.

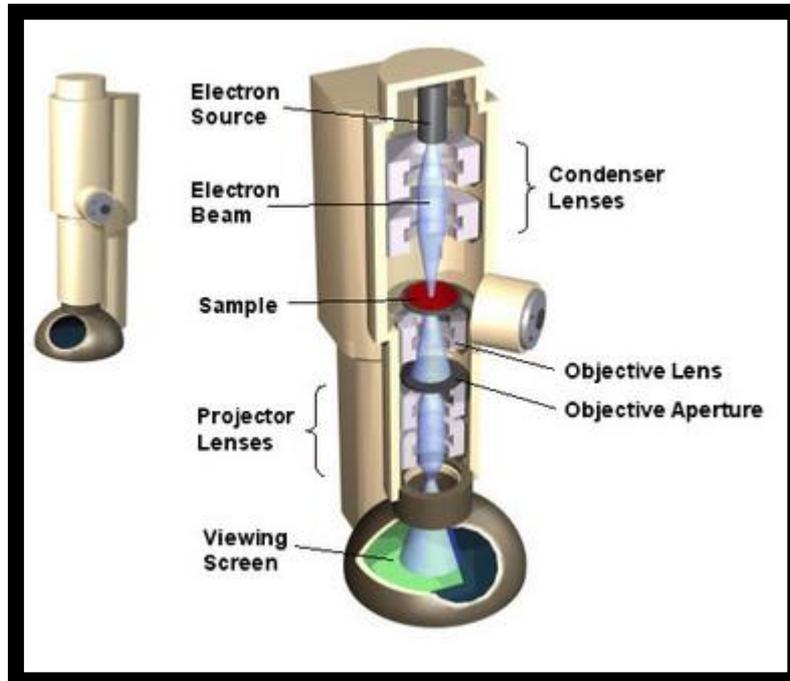


Figura 4. Esquema de microscopio electrónico de transmisión

- **La microscopía electrónica de barrido.** El microscopio electrónico de barrido (SEM) está constituido por un haz de electrones, focalizado a través de un sistema de lentes magnéticas. La interacción del haz de electrones acelerados sobre la muestra lleva consigo la producción de fenómenos diversos: emisión de electrones Auger, electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, etc. La señal tanto de los electrones secundarios como de los retrodispersados permite visualizar una imagen directa de la zona enfocada.

- **La magnetometría de muestra vibrante.** El magnetómetro de muestra vibrante consta de un electroimán (para campos menores de 3 T) o una bobina superconductora (para campos magnéticos altos) que se encargan de generar

el campo magnético sobre la muestra, dos bobinas de detección que son las encargadas de registrar la fuerza electromotriz generada por el movimiento de la muestra, una cámara de temperatura que se ocupa de alcanzar y mantener la temperatura deseada en la medida, un dispositivo de vibración de la muestra que se ocupa de hacerla vibrar a una frecuencia y amplitud deseadas, un amplificador de señal para aumentar la sensibilidad de la medida y por último un ordenador desde el cual se controla el estado del magnetómetro, el tipo de experimento a realizar, las variables de éste y el registro de las distintas medidas llevadas a cabo por el magnetómetro. Para obtener la medida del momento magnético de la muestra, ésta se sitúa entre las bobinas de detección, vibrando a una frecuencia y amplitud característica.

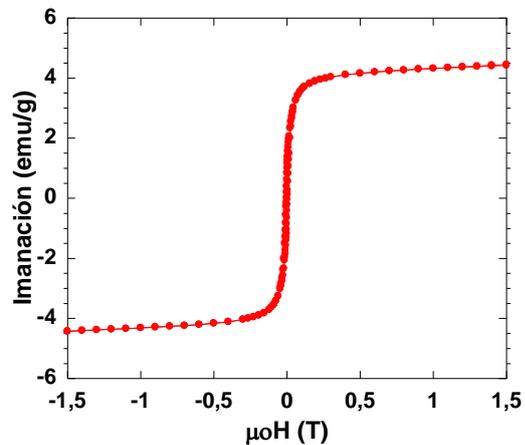


Figura 5. Magnetómetro de muestra vibrante de los servicios generales de la UPV/EHU a la izda. Y curva M-H nHAFe sintetizada

- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia es medida en función de la temperatura. La técnica fue desarrollada por E. S. Watson y M. J. O'neill en 1962. El DSC puede caracterizar todos aquellos cambios que acontecen en la muestra por efecto de la temperatura, y que conllevan absorción o liberación de calor. En el caso de polímeros esta técnica es especialmente útil para el cálculo de temperaturas y entalpías de fusión y de transición vítrea.

Como regla general, puede decirse que todas las transformaciones o reacciones donde se produce un cambio de energía, pueden medirse por DSC. Entre las diversas utilidades de la técnica de DSC podemos destacar las siguientes:

- Medidas de capacidad calorífica aparente (fenómenos de relajación estructural).
- Determinación de temperaturas características de transformación o de transición tales como: transición vítrea (T_g), cristalización (T_c), fusión (T_m), etc.

Los polímeros semicristalinos presentan, por una parte, una transición asociada a la fase a la fase amorfa de los mismos y, por otra parte, una transición en la que desaparecen las entidades ordenadas o cristalinas. Por tanto, la temperatura de transición vítrea es característica de la fase amorfa

La transición más importante en polímeros semicristalinos es la fusión, que aparece a temperaturas más elevadas que la T_g y en la que hay una verdadera transición termodinámica de primer orden.

La temperatura de transición vítrea, T_g , aparece como un punto de inflexión en la curva de flujo de calor, se define como el punto de inflexión de la región. Se trata principalmente de las regiones amorfas del polímero. La cristalización es una transición exotérmica, se produce a temperaturas ligeramente inferiores al punto de fusión del polímero. La cristalización de un polímero depende de la capacidad de sus cadenas para moverse y formar una estructura cristalina. Puede haber un pico de cristalización tanto en la primera como en la segunda rampa de calentamiento. La temperatura de cristalización, T_c , y la entalpía de cristalización, ΔH_c , se definen como el máximo del pico de cristalización y el área bajo la curva de cristalización, respectivamente.

La fusión es una transición endotérmica, el punto de fusión se define como el máximo valor del pico de fusión, T_m . El calor de fusión, ΔH_m , es el área bajo el pico de fusión. Solamente las regiones cristalinas del polímero tienen una temperatura de fusión. El calor de fusión se utiliza para calcular el porcentaje de cristalinidad, X_c calculado como:

$$X_c\% = 100 ((\Delta H_m - \Delta H_{cc}) / \Delta H_m^0) \quad (2.5)$$

Donde, ΔH_m es la entalpía de fusión medida y ΔH_m° es la entalpía de fusión del polímero cristalino al 100%. ΔH_{cc} es la entalpía de cristalización en frío. Para PCL, $\Delta H_m^\circ = 139,5 \text{ J / g}$ [234, 235] y para el PLLA, $\Delta H_m^\circ = 93 \text{ J / g}$ [150, 236, 237].

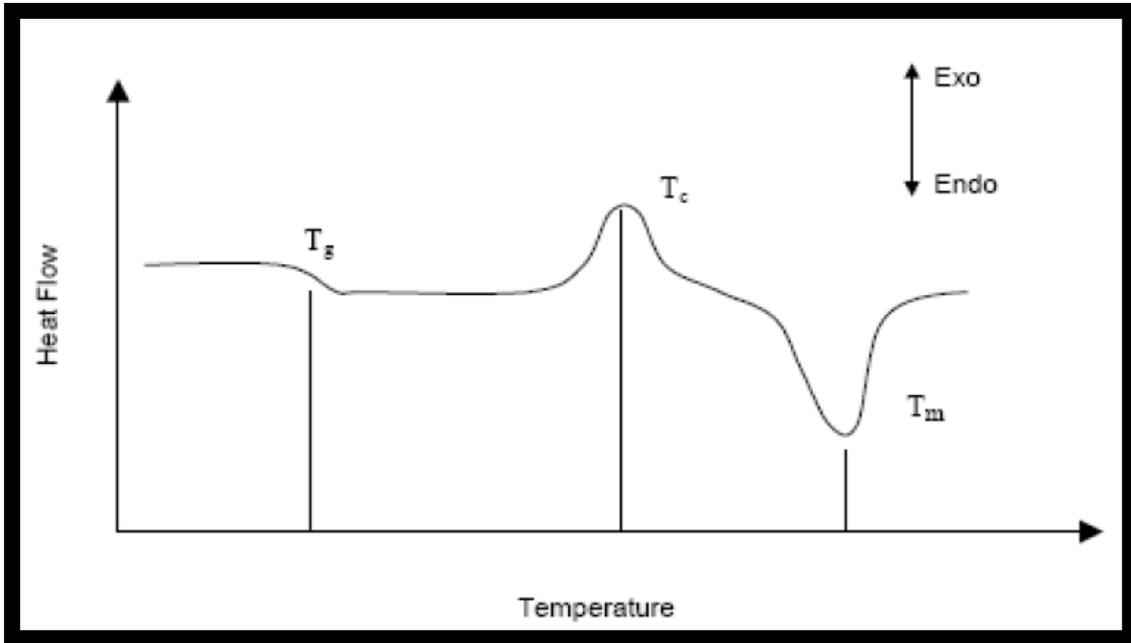


Figura 6.- Esquema de un termograma de soportes porosos

- **La Espectroscopía de Infrarrojo** permite la identificación de los grupos funcionales de un compuesto. Esto es debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, la vibración intramolecular con frecuencia igual a la de la radiación, aumenta en intensidad, lo que genera señales con frecuencias que corresponden a la vibración de un enlace específico.

El ATR (Attenuated Total Reflection) es una técnica de muestreo utilizada en el IR, la cual se produce cuando una radiación infrarroja entra en un cristal ATR transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo de la muestra. Los sólidos no requieren preparación de la muestra con esta técnica.

- **La cromatografía de permeación de gel** o Gel Permeation Chromatography (GPC) es una técnica cromatográfica de exclusión por tamaño; que nos posibilita conocer la distribución de pesos moleculares promedio en peso (M_w), el peso molecular promedio en número (M_n) y el índice de polidispersidad ($I = M_w / M_n$) de un polímero. Se trata de una cromatografía de columna, en la que la fase móvil es el polímero en disolución, generalmente se utiliza tetrahidrofurano (THF) como disolvente, que se hace fluir a través de una columna rellena con un gel microporoso con una distribución de poros perfectamente definida, y cuya elección dependerá de la resolución y el peso molecular del polímero a fraccionar, que constituye la fase estática.

El gel tiene la función de tamiz molecular, y separa las macromoléculas en función de su tamaño, teniendo las moléculas de mayor tamaño acceso únicamente a los poros mayores eluyendo antes, mientras que las de menor tamaño se quedan retenidas en el gel tardando más tiempo, produciéndose de este modo una elución gradual en función del tamaño molecular de mayor a menor tamaño, pudiendo detectarse, mediante un detector adecuado la concentración del polímero. De este modo podemos relacionar la concentración y el peso molecular, lo que nos permite determinar la distribución de pesos moleculares de la muestra.

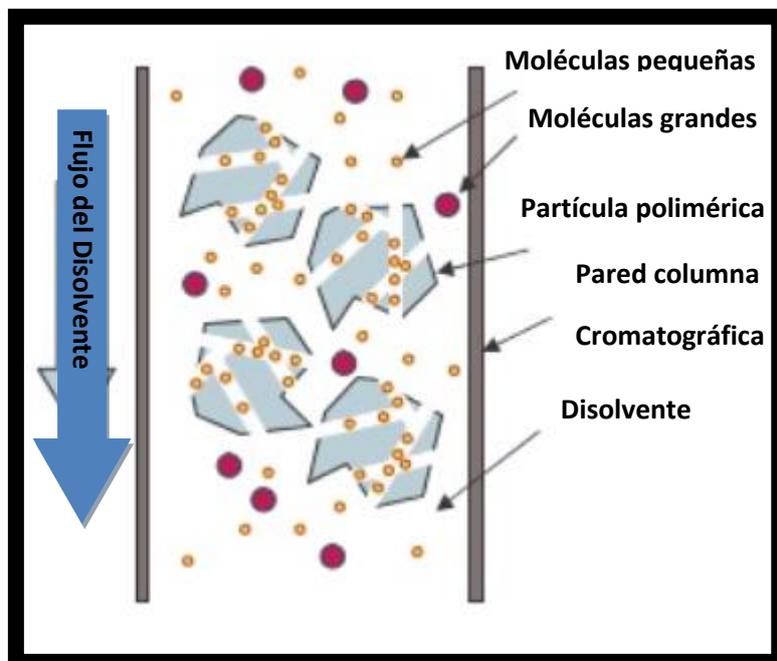


Figura 7. Esquema del proceso de separación por cromatografía de exclusión por tamaños, tomado de [238].

Publicaciones

- I. P. Lázpita , J.M. Barandiarán, V.A. Chernenko, B. Valle García, E. Díaz Tajada, T. Lograsso, D.L. Schlagel, “Magnetic properties of Ni_{40+x}Mn_{39-x}Sn₂₁ (x = 0, 2, 4, 6 and 8 at.%) Heusler alloys”, *Journal of Alloys and Compounds* 594 (2014) 171–174
- II. E. Díaz, I. Sandonis, M.B. Valle, “In vitro degradation of poly (caprolactone)/nHA Composites”. *J. Nanomater*, (2014) , Article ID 802435
- III. E. Díaz, M. B. Valle & J. M. Barandiarán, “Magnetic composite scaffolds of polycaprolactone/nFeHA, for bone-tissue engineering”, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, (2016) 65:12, 593-600, DOI: 10.1080/00914037.2016.1149848

Bibliografía

- [1] B .D. Ratner, S.J. Bryant, *Annu Rev Biomed Eng* 2004, 6, 41-75
- [2] J. Robinson, P.M. Saint Louis, A. Padmaraju, "Introduction to polymers" University at Buffalo-SUNY (2001)
- [3] D .F. Williams, "Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials" Elsevier 1987
- [4] D. F. Williams, J. Black, P. J. Doherty, "Second consensus conference on definition in biomaterials" *Biomaterials-Tissue Interfaces* Elsevier 1992
- [5] D. F. William, *Mater Sci Technol* 1987, 3, 797
- [6] D. F. William, "Definitions in Biomaterials", Elsevier, Amsterdam, 1987, 49
- [7] D. F. Williams, "Biocompatibility of Implant Materials" Sector Publishing Limited 1976
- [8] R. G. Kulkarni, A.F. Moore, A.F. Hegyeli, F. Leonard, *J Biomed Mater Res* 1971, 5, 169
- [9] R. K. Kulkarni, K.C. Pani, C. Neuman, F. Leonard, *Arch Surg* 1966, 93, 839
- [10] Julio San Román *Revista de Plásticos Modernos*, 1990, Vol 77, Nº 511, 60-70
- [11] M. Vallet-Regí. "Tendencias en Biomateriales". EIDON 33 Plataforma de debate.
- [12] M Repetto. "Toxicología fundamental. Métodos alternativos. Toxicidad in Vitro". Tercera Edición, Ediciones Díaz de Santos, Sevilla, España.: Enseps-Mercie Group; 2002, 303-5.
- [13] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Inuminol. Methods*, 65: 55-63, 1983.
- [14] F. Denizot, and R. Lang, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to this tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability", *J. Immunol. Methods*, 89: 271-277, 1986.
- [15] C.H. Hauman, R.M. Love, "Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances", *Int Endod J.* 2003; 36(2):75-85.
- [16] J. C. Wataha, "Predicting clinical biological responses to dental materials", *Dent Mater.* 2012; 28(1):23-40.
- [17] E. Unlund y A. C Albertson "Polyesters Based on Diacid Monomers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 585-609, 2003.
- [18] L. Wang, W. Ma, R. A. Gross y S. P. McCarthy; "Reactive compatibilization of biodegradable blends of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone)". *Polymer Degradation and Stability*, 59, 1-3, 161-168, 1998.
- [19] Y. H. Na, Y. He, X. Shuai, "Compatibilization Effect of Poly(ϵ -caprolactone)-b-Poly(Ethyleneglycol) Block Copolymers and Phase Morphology Analysis in Inmiscible Poly(lactide)/Poly(ϵ -caprolactone) Blends". *Biomacromolecules*, 3, 1179-1186, 2002.
- [20] A. Torres, S. M. Li , M. Vert, "Poly(lactic acid) Degradation in Soil or Under Controlled Conditions" *Journal of Applied Polymer Science*, 62, 2295-2302, 1996.
- [21] H. Tsuji , Miyauchi; "Poly(-lactide): 7. Enzymatic Hydrolysis of Free and Restricted Amorphous Regions in poly(-lactide) films with different crystallinities and a fixed crystalline thickness". *Polymer*, 42, 9, 4463-467, 2001.
- [22] E. Díaz, I. Sandonis, I. Puerto, I. Ibañez, "In Vitro Degradation of PLLA/ nHA Composite Scaffolds". *Polymer Engineering and Science*, DOI 10.1002/pen.23806, 2014.
- [23] S. J. Holland, B.J. Tighe. "Biodegradable polymers", In: Ganderton D, Jones TJ, editors. *Advances in pharmaceutical science*, vol. 6. London: Academic Press Inc.; 1992. p. 101-64.
- [24] J. C. Middleton, A.J. Tipton, "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices", *Biomaterials* 2000;21:2335-46.

- [25] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering". *Eur Cells Mater* 2003; 5:1–16.
- [26] M. A. Woodruff, D. Werner, "The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century", *Progress in Polymer Science*, 35 (10), 1217-1256, 2010.
- [27] F. Henry, L. C. Costa y M. Devassine "The Evolution of Poly (lactic acid) degradability by dielectric spectroscopy measurements" *European Polymer Journal*, 41, 2122-2126, 2005.
- [28] A. Htay, S. Teoh, D. Hutmacher, "Development of perforated microthin poly(ϵ -caprolactone) films as matrices for membrane tissue engineering"; *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 15, No.5 (2004) 683-700.
- [29] M. Huang, S. Li, D. W. Hutmacher, J. Coudane, M.I Vert "Degradation Characteristics of Poly(ϵ -caprolactone)-Based Copolymers and Blends"; Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com); DOI 10.1002/app.24196
- [30] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, P. Wang, "The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant", *Biomaterials* 2006;27:1735–40.
- [31] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, "Biomaterials" Science Academic Press San Diego 1996?
- [32] N. Bock, A. Riminucci, C. Dionigi, A. Russo, A. Tampieri, E. Landi, V.A. Goranov, M. Marcacci, V. Dediu, *Acta Biomater.* 6, 786 (2010).
- [33] A. S. P. Lin, T. H. Barrows, S. H. Cartmell, R. E. Guldberg, *Biomaterials* 24, 481 (2003).
- [34] Y. Wan, J. Dai, Q. Zhang, Y. Xiao, M. Lag, *Appl.Surf. Sci.*, 256, 6107 (2012).
- [35] H. Wang, Y. Li, Y. Zuo, J. Li, S. Ma, L. Cheng, *Biomaterials* 24, 3338 (2007).
- [36] H. Cao, N. Kuboyama, *Bone* 46, 386 (2010).
- [37] Q. Wu, X. Zhang, B. Wu, W. Huang, *Mater. Lett.* 92, 274 (2013).
- [38] L. Pang, Y. Hu, Y. Yan, L. Liu, Z. Xiong, Y. Wei, J. Bai, *Surf. Coat. Technol.* 201, 9549 (2007).
- [39] V. Canillo, F. Chiellini, P. Fabbri, A. Sola, *Compos. Struct.* 92, 1823 (2010).
- [40] A. M. Deliormanli, M. N. Rahaman, *J. Eur. Ceram. Soc.* 32, 3637 (2012).
- [41] Q. Fu, E. Saiz, A.P. Tomsia, *Acta Biomater.* 7, 3547 (2011).
- [42] S. Chandra, K. C. Barick, D. Bahadur, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 63, 1267 (2011).
- [43] A. A. M. Elsherbini, M. Saber, M. Aggag, A. El-Shahawy, H.A.A. Shokier, *Mag. Reson. Imaging* 29, 272 (2011).
- [44] A. Figuerola, R. Di Corato, L. Manna, T. Pellegrino, *Pharmacol. Res.* 62, 126 (2010).
- [45] J. O. Mangual, M. O. Avilés, A. D. Ebner, J. A. Ritter, *J. Magn. Magn. Mater.* 323, 1903 (2011).
- [46] H. Kempe, M. Kempe, *Biomaterials* 31, 9499 (2010).
- [47] M. Marín Ruiz, L. San Hipólito Marín, C. Belarra Arenas, F. Martín Gómez, J. M. Martínez-González, "Injertos sustitutos no óseos. Aportaciones del ácido poliláctico y Poliglicólico". *Av Periodon Implantol.* 2009; 21, 1: 45-52.
- [48] M. Wang et Al., "PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation" *Biofabrication*, 4, 2012.
- [49] A. Södergard, M. Stolt, "Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition", *Progress in Polymer Science*, 27, 1123-1163, 2002.
- [50] J. Pelouze, *Justus Liebigs Ann Chemie* 1845, 13, 112
- [51] J. M. Pachence, J. Kohn, in "Principles of tissue engineering" , ed. by R. Lanza et al. New York, Academic Press 1997, 273.
- [52] J. Jin, S. I. Jeong, Y. M. Shin, K. S. Lim, H. S. Shin, Y. M. Lee, H. C. Koh, K. S. Kim, "Transplantation of mesenchymal stem cells within within a poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffold improves cardiac function in a rat myocardial infarction model". *Eur J Heart Fail* 2009, 11, 147-153.
- [53] T. Oya, N. J. Yui, *Biomater Sci, Polym Edn* 1997, 8, 437
- [54] B.D. Cullity, "Introduction to Magnetic Materials". Addison-Wesley:(EEUU) (1972)
- [55] D. Jiles, "Introduction to Magnetism and Magnetic Material". Taylor&Francis,1991.

- [56] Y. L. Raikher, M.I. Shliomis, "Limiting Viscosity of Ferromagnetic Suspensions in a Strong Magnetic Field". *O predel'noi vyazkosti ferromagnitnykh suspenzii v sil'nom magnitnom pole*. 1974, (4), 41-48.
- [57] X. Battle, A. Labarta, "Finite-size effects in fine particles: Magnetic and transport properties", *Journal of Physics D: Applied Physics* 2002, 35, (6), R15- R42.
- [58] C. J. Serna, F. Bødker, S. Mørup, M.P. Morales, F. Sandiumenge, S. Veintemillas-Verdaguer, "Spin frustration in maghemite nanoparticles". *Solid State Communications* 2001, 118, (9), 437-440.
- [59] Y. W. Jun, J. W. Seo, J. Cheon, "Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences". *Accounts of Chemical Research* 2008, 41, (2), 179-189.
- [60] D. L. Leslie-Pelecky, R.D. Rieke, "Magnetic properties of nanostructured materials". *Chemistry of Materials* 1996, 8, (8), 1770-1783.
- [61] J. Frenkel, J. Dorfman, "Spontaneous and induced magnetisation in ferromagnetic bodies". *Nature* 1930, 126, 274-275.
- [62] C. Kittel, "Theory of the structure of ferromagnetic domains in films and small particles". *Physical Review* 1946, 70, (11-12), 965-971.
- [63] L. Néel, "Theorie du trainage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites". *Annual Geophysics* 1949, 5, 99-136.
- [64] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", *Journal of Physics D: Applied Physics* 2003, 36, R167-R181.
- [65] X. J. Huang, D. Zhuang, H. Chen, F. Liu, X. Tang, X. Yan, L. Meng, L. Zhang, J. Ren, "General strategy for designing functionalized magnetic microspheres for different bioapplications", *Langmuir*, (2009), 25 (19), pp.11657-63.
- [66] R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs y J. Lewis (1989), "Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity" *AJR Am J Roentgenol.*, 152 (1), pp. 167-73.
- [67] M. Vallet-Regí, *An. Quím.* 2011, 107(1), 28–35]
- [68] A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth (2007), "Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application", *Angew Chem Int Ed Engl.*, 46 (8), pp. 1222–44.
- [69] R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel y L. Josephson (1990), "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterization of a new class of contrast agents for MR imaging", *Radiology*, 175, pp. 489–493.
- [70] G. Storm, S. Belliot, T. Daemen, D. D. Lasic (1995), "Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17, pp. 31–48.
- [71] Gupta et al., "Temperature and pH sensitive hydrogels: an approach towards smart semen-triggered vaginal microbicidal vehicles", *J. Pharm. Sci.* (2007). 96 (3): 670-681.
- [72] C.M. Lee, D. Jang, J. Kim, S. J. Cheong, E. M. Kim, M. H. Jeong, S. H. Kim, D. W. Kim, S. T. Lim, M. H. Sohn, Y. Y. Jeong, H. J. Jeong (2011), "Oleyl-Chitosan Nanoparticles Based on a Dual Probe for Optical/MR Imaging in Vivo", *Bioconjug Chem.*, 22 (2), pp.186-92.
- [73] T. K. Jain, M. K. Reddy, M. A. Morales, D. L. Leslie-Pelecky, V. Labhasetwar, "Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats". *Molecular Pharmaceutics* 2008, 5, (2), 316-327.
- [74] A. Senyei, K. Widder, G. Czerlinski, "Magnetic guidance of drug-carrying microspheres". *Journal of Applied Physics* 1978, 49, (6), 3578-3583.
- [75] C. Chouly, D. Pouliquen, I. Lucet, J. J. Jeune y P. Jallet (1996), "Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution", *Journal of Microencapsulation*, 13, pp.245–255.
- [76] R. Gerber, "Magnetic separation". *Applied Magnetism* 1994, 253, 165-220.
- [77] M. Zborowski, "Physics of magnetic cell sorting". *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* 1997, 205-231.
- [78] G. P. Hatch, R. E. Stelter, "Magnetic design considerations for devices and particles used for biological high-gradient magnetic separation (HGMS) systems", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2001, 225, (1-2), 262-276.

- [79] M.H. Falk and R.D. Issels. *Int. J. Hyperthermia*, 17 (2001) 1
- [80] J.R. Daniels, US 4,708,718, 1987
- [81] A. Tampieri, T. D'Alessandro, M. Sandri, S. Sprio, E. Landi, L. Bertinetti, S. Panseri, G. Pepponi, J. Goettlicher, M. Bañobre-López, J. Rivas; "Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite". *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 843–851.
- [82] E. Díaz, I. Puerto, I. Sandonis, I. Ibañez, "Morphology and Mechanical Properties of PLLA and PCL Scaffolds". *Polim Plast Technol.* 2013. 52, 1-6. DOI: 10.1080/03602559.2013.843699
- [83] S. Panseri, C. Cunha, T. D'Alessandro, M. Sandri, G. Giavaresi, M. Marcacci, C. T. Hung and A. Tampieri, *J. Nanobiotechnol.*, 2012, **10**, 32
- [84] M. Iafisco, M. Sandri, S. Panseri, J. M. Delgado-Lopez, J. Gomez-Morales and A. Tampieri, *Chem. Mater.*, 2013, **25**, 2610-2617.
- [85] A. Gloria, T. Russo, U. D'Amora, S. Zeppetelli, T. D'Alessandro, M. Sandri, M. Banobre-Lopez, Y. Pineiro-Redondo, M. Uhlarz, A. Tampieri, J. Rivas, T. Herrmannsdorfer, V. A. Dediu, L. Ambrosio and R. De Santis, *J. R. Soc., Interface*, 2013, **10**.
- [86] M. Iafisco, C. Drouet, A. Adamiano, P. Pascaud, M. Montesi, S. Panseri, S. Sarda and A. Tampieri, "Superparamagnetic iron-doped nanocrystalline apatite as delivery system for doxorubicin", *J. Mater. Chem. B*, 2015, DOI: 10.1039/C5TB01524C.
- [87] J. Wang, T. Nonami and K. Yubata, *J. Mater Sci: Mater. Med*, 2008, 19, 2663-2667.
- [88] H. M. Kim, C. Rey, M.J. Glimcher, Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature, *J. Bone Miner. Res.* 10 (1995) 1589-1601.
- [89] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, S. Cazalbou, D. Grossin, F. Brouillet and S. Sarda, *Prog.Cryst. Growth Charact. Mater.*, 2014, **60**, 63-73.
- [90] S. Panseri, M. Montesi, M. Sandri, M. Iafisco, A. Adamiano, M. Ghetti, G. Cenacchi and A. Tampieri, *J. Biomed. Nanotech.*, 12(2016), 909–921.
- [91] M. E. Zilm, M. Staruch, M. Jain and Mei Wei; *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 7176–7185
- [92] Scherrer, P. Bestimmung der Grosse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Rontgenstrahlen. *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen* 1918, 26, 98.
- [93] Rodriguez-Carvajal, J. An introduction to the program FULLPROF, 2000; Laboratoire Leon Brillouin (CEA-CNRS), Gif sur Yvette, France, 2001.
- [94] B. D. Hall, D. Zanchet, D. Ugarte. *J. Appl. Cryst.*, 33 (2000) 1335
- [95] Y. Zhu and Q. Wu. *J. Nanopart. Res.*, 1 (1999) 393
- [96] K. A. Gross, R. Jackson, J.D. Cashion, and L.M.Rodriguez-Lorenzo, *European Cells and Materials Vol. 3. Suppl. 2*, 2002 , 114-117.
- [97] L. Tauxe, T.A.T. Mullender, and T. Pick; *Journal of Gophysical Research*, 1(1996); 577-583
- [98] Z. Mo, C. Zhang, R. Guo, S. Meng, and J. Zhang, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011, 50, 3534–3539.
- [99] K. M. T. Ereiba, A. G. Mostafa, G. A. Gamal, and A. H- Said, *Journal of Biophysical Chemistry* 4 (2013) 122-130
- [100] T. Iwasaki, R. Nakatsuka, K. Murase, H. Takata, H. Nakamura, and S. Watano, *Int. J. Mol. Sci.*, 2003, 14, 9365-9378.
- [101] X. Wang, "Preparation of magnetic hydroxyapatite and their use as recyclable adsorbent for phenol in wastewater". *Clean* 2011, 39, 13–20.
- [102] C. Shu, W. Yanwei, L. Hong, P. Zhengzheng, Y. Kangde, "Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanofibers by mechanochemical methods", *Ceram. Int.* 2005, 31, 135–138.
- [103] C. W. Chen, C.S. Oakes, K. Byrappa, R. E. Riman, K. Brown, K. S. TenHuisen, V. F. Janas, "Synthesis, characterization, and dispersion properties of hydroxyapatite prepared by mechanochemical-hydrothermal methods". *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 2425–2432.
- [104] J. C. Elliott, "Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates"; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1994.
- [105] P. Regnier, A. C. Lasaga, R. A. Berner, O. H. Han, K. W. Zilm, "Mechanism of CO₃ 2– substitution in carbonate-fluorapatite: Evidence from FTIR spectroscopy, 13C NMR, and quantum mechanical calculations." *Am. Miner.* 1994, 79, 809–818.
- [106] S. Koutsopoulos, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, 62, 600-612.

- [107] K. Donadel, M.D.V. Felisberto, and M.C.M. Laranjeira, *An Acad Bras Cienc*, 2009, 2, 81.
- [108] S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang and G. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 273–279.
- [109] J. Zhao, L.Y. Guo, X.B. Yang, J. Weng, *Applied Surface Science* 255 (2008) 2942–2946
- [110] F.E. Wiria, K.F. Leong, C.K. Chua, Y. Liu, “Poly-ε-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering”, *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 1–12
- [111] S. A. Casarin, S. M. Malmonge, M. Kobayashi, J. A. Marcondes Agnelli, “Study on In Vitro Degradation of Bioabsorbable Polymers Poly(Hydroxybutyrate-Co-Valerate)- (PHBV) and Poly(Caprolactone)-PCL”, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2, 207, 2011.
- [112] H. Y. Kweon, M. K. Yoo, I. K. Park, T. H. Kim, H. C. Lee, H. S. Lee, J. S. Oh, T. Akaike, C. S. Cho, “A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering”, *Biomaterials*, 24, 801-808, 2003.
- [113] P. Taddei, A. Tinti, M. Reggiani, C. Fagnano, “In vitro mineralization of bioresorbable poly (ε-caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation”, *Journal of Molecular Structure*, 744, 135-143, 2005.
- [114] H. Seyednejad, D. Gawlitta, R. V. Kuiper, A. de Bruin, C. F. van Nostrum, T. Vermonden, W. J. A. Dhert, W. E. Hennink, “In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on hydroxyl-functionalized poly(ε-caprolactone)”, *Biomaterials*, 33, 4309-4318, 2012.
- [115] B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri, K. Mekaapiruk, P. Supaphol, P. Pavasant, “Polycaprolactone/ Hydroxyapatite composite scaffolds: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells”, *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 94A, 241-251, 2010.
- [116] Y. Wang, L. Liu, S. Guo, “Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/ polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro”, *Polymer Degradation and Stability*, 95, 207-213, 2010.
- [117] Lam CXF, Hutmacher DW, Schantz J-T, Woodruff MA, Teoh SH. “Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo”. *J Biomed Mater Res Part A* 2008; 90:906–19.
- [118] Diaz, E.; Sandonis, I.; Valle, M.B. “In vitro degradation of poly (caprolactone)/nHA Composites”. *J. Nanomater*, 2014, Article ID 802435
- [119] D’Alessandro Teresa, “Development of newly conceived biomimetic nano-structured biomaterials as scaffolds for bone and osteochondral regeneration”, Thesis Doctoral, Università di Bologna, 2013.
- [120] M. Banobre-Lopez, Y. Pineiro-Redondo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, A. Tampieri, V. Dediu and J. Rivas, *J. Appl. Phys.*, 2011, 109, 07B313.
- [121] G. Daculsi, N. Passuti, *Biomaterials* 11 (1990) 86.
- [122] T.D. Roy, J.L. Simon, J.L. Ricci, E.D. Rekow, V.P. Thompson, J.R. Parsons, *J. Biomed. Mater. Res. A* 66 (2) (2003) 283.
- [123] T.M. Chu, D.G. Orton, S.J. Hollister, S.E. Feinberg, J.W. Halloran, *Biomaterials* 23 (5) (2002) 1283.
- [124] K.U. Lewandrowski, J.D. Gresser, S. Bondre, A.E. Silva, D.L. Wise, D.J. Trantolo, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11 (8) (2000) 879.
- [125] J.X. Lu, B. Flautre, K. Anselme, P. Hardouin, A. Gallur, M. Descamps, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 10 (2) (1999) 111.
- [126] M. Gutierrez, M.A. Lopes, N.S. Hussain, A.F. Lemos, J.M.F. Ferreira, A. Afonso, A.T. Cabral, L. Almeida, J.D. Santos, *Acta Biomater.* 4 (2008) 370.
- [127] J.J. Kim, R.K. Singh, S.J. Seo, T.H. Kim, J.H. Kim, E.J. Lee and H.W. Kim, *RSC Adv.*, 2014, 4, 17325–17336.
- [128] Schugens, C., Maquet, V., Grandfils, C., Jerome, R., and Teyssie, P. “Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation .1.Preparation of macroporous polylactide supports by solid- liquid phase separation”, *Polymer* 37, (1996a) ,1027-1038.
- [129] Nam, Y.S. and Park, T.G. (1999) Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research* 47, 8- 17.

- [130] Q. Zhang, Y. Jiang, Y. Zhang, Z. Ye, W. Tan, M. Lang, "Effect of porosity on long-term degradation of poly (ϵ -caprolactone) scaffolds and their cellular response, *Polymer Degradation and Stability*, 98 (2012), 209-218.
- [131] Fossard, Arnaud, Proyecto de fin de carrera "Desarrollo de andamios porosos biodegradables 3D para la ingeniería de tejidos", Universitat Politècnica de Catalunya, 2005-02.
- [132] C.M. Murphy, M.G. Haugh, F. J. O'Brien, "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering" *Biomaterials* 31 (2010) 461-466
- [133] R. Zhang, et al. "Processing of Polymer Scaffolds: Phase Separation". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, 715-724.
- [134] Y. Guo, Y. Zhou, D. Jia, Q. Meng, "Fabrication and in vitro characterization of magnetic hydroxycarbonate apatite coatings with hierarchically porous structures", *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 923-931
- [135] C.J. Steenberg and H. Birkedal, "Modification of bone-like apatite nanoparticle size and growth kinetics by alizarin red S", *Nanoscale*, 2010, 2, 2478-2486.
- [136] P.N. Kumta, C. Sfeir, D.-H. Lee, D. Olton and D. Choi, Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization, *Acta Biomater.*, 2005, 1, 65-83.
- [137] J. Peña, T. Corrales, I. Izquierdo-Barba, A.L. Doadrio, M. Vallet-Regí, "Long term degradation of poly(3-caprolactone) films in biologically related fluids", *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006) 1424e1432.
- [138] P. Taddei, M. Di Foggia, F. Causa, I. Ambrosio, C. Fagnano, *In vitro* bioactivity of poly(ϵ -caprolactone)-apatite (PCL-AP) scaffolds for bone tissue engineering: The influence of the PCL/AP ratio, *The International Journal of Artificial Organs / Vol. 29 / no. 7*, 2006 / pp. 719-725.
- [139] M. Iafisco, B. Palazzo, T. Ito, M. Otsuka, M. Senna, J.M. Delgado-Lopez, J. Gomez-Morales, A. Tampieri, M. Prat and L. Rimondini, "Preparation of core-shell poly(L-lactic) acid-nanocrystalline apatite hollow microspheres for bone repairing applications", *J Mater Sci: Mater Med* (2012) 23:2659-2669.
- [140] J. L. Varela-Caselis, E. Reyes-Cervantes, E. Rubio-Rosas, "Crecimiento en fluido fisiológico simulado de hidroxiapatita sobre películas de PMMA-Sílice-CaO", *Superficies y vacío*, 25, 92-95, 2011.
- [141] Gautam S., Dinda A.K., Mishra N.C., "Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method", *Materials Science and Engineering*, 33, 1228-1235, 2013.
- [142] A.C.F.M. Costa., M. G. Lima, L.H.M.A. Lima., V. V. Cordeiro, K.M.S. Viana, C. V. Souza, H. L. Lira, "Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações", *Revista Electronica de Materiais e Processos*, 4.3, 29-38, 2009.
- [143] H. J. Hoffmann. "Theory for the spectral transmittance of Christiansen filters made of glass beads". *Appl Phys B*. 2000;70(6): 853-61.
- [144] Z. F. Su, S. G. Sun, C. X. Wu, Z. P. Cai, "Study of anomalous infrared properties of nanomaterials through effective medium theory", *J Chem Phys*. 2008; 129(4):044707.
- [145] Li, Qi, "Biodegradation Study of Polymeric Material with Various Levels of Molecular Orientation Induced via Vibration-Assisted Injection Molding" (2012). Theses and Dissertations. Paper 1130.
- [146] M. Y. Razzag, M. Anhalt, L. Frommann, B. Weidenfeller, "Thermal, electrical and magnetic studies of magnetite filled polyurethane shape memory polymers", *Mater Sci Eng A*, 2007, 444:227-235.
- [147] K. Gall, M. L. Dunn, Y. Liu, D. Finch, M. Lake, N. A. Munshi, "Shape memory polymer nanocomposites". *Acta Mater*, 2002, 50:5115-5126.
- [148] A.K. Bajpai, R. Gupta, "Synthesis and Characterization of Magnetite (Fe_3O_4)—Polyvinyl Alcohol-Based Nanocomposites and Study of superparamagnetism", *Polymer Composites*, 2010, 245-255
- [149] S. A. M. Ali, P. J. Doherty and D. F. Williams. "Mechanisms of Polymer Degradation in Implantable Devices. 2. Poly(DL-lactic acid)". *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 27, 1409-1418 (1993).

- [150] Z. Zhou, Q. Yi, L. Liu, X. Liu, Q. Liu, "Influence of degradation of poly-L-lactide on mass loss, mechanical properties, and crystallinity in phosphate-buffered solution". *J. Macromol. Sci., Part B: Phys.* 2009, 48, 309.
- [151] S. M. Li, H. Garreau, M. Vert, "Structure–property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α –hydroxy acids) in aqueous media, Part 2: degradation of lactide–glycolide copolymers". *J. Mater. Sci.* 1990, 1, 131.
- [152] J. W. Leenslag, A. J. Pennings, R. R. M. Bos, F. R. Rozema, G. Boering, "Resorbable materials of poly(L-lactide) VIII. In vivo and in vitro degradation". *Biomaterials* 1987, 8, 311.
- [153] E. W. Fisher, H. J. Sterzel, G. Wegner, "Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions". *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere* 1973; 251: 980-90.
- [154] F. Yang, W. Cui, Z. Xiong, L. Liu, J. Bei, S. Wang, "Poly(L,L-lactide-coglycolide)/ tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro". *Polymer Degradation and Stability.* 2006, 91, 3065-3073.
- [155] C. T. Lee, Y. D. Lee, "Preparation of porous biodegradable poly(lactide-coglycolide)/hyaluronic acid blend scaffolds: Characterization, in vitro cells culture and degradation behaviours". *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2006, 17 (12), 1411–1420.
- [156] H. Li, R. Du and J. Chang, "Fabrication, Characterization, and in vitro Degradation of Composite Scaffolds Based on PHBV and Bioactive Glass", *Journal of Biomaterials Applications*, 2005, 20, 137-155
- [157] Luis Andrés Gaona Corral, "Materiales compuestos con base en matrices poliméricas biodegradables para uso en reparación y regeneración de tejido óseo", Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica Bogotá D.C. Colombia ,2013.
- [158] X. Yu, S. Zhou, X. Zheng, Y. Xiao, and T. Guo, "Influence of in Vitro Degradation of a Biodegradable Nanocomposite on Its Shape Memory Effect", *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 17630–17635
- [159] F. Yang, W. Cui, Z. Xiong.; L. Liu, J. Bei.; S.Wang, "Poly(L,L-lactide-coglycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Polymer Degradation and Stability.* 2006, 91, 3065-3073.
- [160] T. Niemela, "Effect of b-tricalcium phosphate addition on the in vitro degradation of self-reinforced poly-L,D-lactide", *Polymer Degradation and Stability* 89, 2005, 492-500.
- [161] M. Vert, S. Li, H. Garreau. More about the degradation of LA/GA derived matrices in aqueous media. *J Controlled Release* 1991; 16:15-26.
- [162] X. Zheng, S. Zhou, X. Yu, X. Li, B. Feng, S. Qu, J. Weng "Effect of In Vitro Degradation of Poly(D,L-lactide)/b-tricalcium Composite on Its Shape-Memory Properties, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 170-180
- [163] M. C. Azevedo, M. B. Claase, D. W. Grijpma, J. Feijen, "Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials". *J. Mater. Sci.* 2003, 14, 103-107.
- [164] R. De Santis, A. Gloria, T. Russo, et al. "A basic approach toward the development of nanocomposite magnetic scaffolds for advanced bone tissue engineering". *Journal of Applied Polymer science.* 2011;122:3599-3605.
- [165] J. Daňkova, M. Buzgo, J. Vejpravov, et al. "Highly efficient mesenchymal stem cell proliferation on poly- ϵ -caprolactone nanofibers with embedded magnetic nanoparticles", *Int J. nanomedicine.* 2015; 10:7307-7317.
- [166] H.M. Yun, E.S. Lee, M.J. Kim, J.J Kim, J.H. Lee, H.H Lee, K.R. Park, J.K. Yi, H.W. Kim, E.C Kim, "Magnetic Nanocomposite Scaffold-Induced Stimulation of Migration and Odontogenesis of Human Dental Pulp Cells through Integrin Signaling Pathways", *PLoS One* 2015; 10:e0138614.
- [167] H.M. Yun, S.J. Ahn, K.R. Park ,M. J. Kim,J.J. Kim,G.Z. Jin, H. W. Kim, E. C. Kim, "Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. *Biomaterials.* 2016; 85:88-98.
- [168] F.J. Hua, T.G. Park, D.S. Lee, "A facile preparation of highly interconnected macroporous poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) scaffolds by liquid–liquid phase separation of a PLGA–dioxane–water ternary system". *Polymer* 44 (2003) 1911–1920.

- [169] Thesis by Montse Charles-Harris Ferrer, "Development and Characterisation of Completely Degradable Composite Tissue Engineering Scaffolds", Barcelona 2007
- [170] Y. Mosleh, N. G. Ebrahimi, •A. Mahdavian, M. Ashjari, "TPU/PCL/nanomagnetite ternary shape memory composites: studies on their thermal, dynamic-mechanical, rheological and electrical properties",
- [171] Z. Es'haghi, A. Nezhadali, A.D. Khatibi, "Magnetically responsive polycaprolactone nanoparticles for progesterone screening in biological and environmental samples using gas chromatography", *Anal Bioanal Chem*, DOI 10.1007/s00216-016-9650-5.
- [172] A. C. Motta, & E. A. R. Duek, - *Polimeros*, 11, p.340 (2006).
- [173] M.A. T. Duarte, E.A. R Duek,, A.C. Motta , "In Vitro Degradation of Poly (L-co-D,L lactic acid) Containing PCL-T", *Polimeros*, vol. 24, n. 1, p. 1-8, 2014.
- [174] G.Baraúna, - "Peripheral nerve regeneration", Dissertation, State University Campinas (2007).
- [175] M. Swietek, W. Tokarz, J. Tarasiuk, S. Wronski and M. Blazewicz, *Magnetic Polymer Nanocomposite for Medical Application*, ACTA PHYSICA POLONICA A No. 4, Vol. 125 (2014)
- [176] L.K. Shen, K. H. Fan, T. L. Wu, H. M. Huang, T. K. Leung, C. J. Chen and W .J Chang, "Fabrication and magnetic testing of a poly-Llactide biocomposite incorporating magnetite nanoparticles", *J Polym Eng* 2014; 34(3): 231–235.
- [177] M. Hamoudeh, A. A. Faraj, E. Canet-Soulas, F. Bessueille, D. L'éonard, H. Fessi, "Elaboration of PLLA-based superparamagnetic nanoparticles: Characterization, magnetic behaviour study and in vitro relaxivity evaluation", *International Journal of Pharmaceutics* 338 (2007) 248–257.
- [178] L. Lu, S. J. Peter, M.D. Lyman, H. L. Lai, S.M. Leite, J.A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer, A.G. Mikos, " In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams". *Biomaterials* 2000; 21:1837–45.
- [179] E. L. Hedberg, C. K. Shih, J. J. Lemoine, M. D. Timmer, M. A. K. Liebschner, J. A. Jansen, A. G. Mikos, "In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds", *Biomaterials* 26 (2005) 3215–3225
- [180] X. Yu, S. Zhou, X. Zheng, Y. Xiao, and T. Guo, "Influence of in Vitro Degradation of a Biodegradable Nanocomposite on Its Shape Memory Effect", *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 17630–17635
- [181] X.L. Deng, G. Sui, M.L. Zhao, G.Q. Chen, X.P. Yang, "Poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007, 18 (1), 117–130.
- [182] F. Wu, C. Liu, B. O'Neill, J. Wei, Y. Ngothai, "Fabrication and properties of porous scaffold of magnesium phosphate/polycaprolactone biocomposite for bone tissue engineering", *Applied Surface Science* 258 (2012) 7589– 7595.
- [183] J. Huang, J. Xiong, J. Liu, W. Zhu and D. Wang, " Investigation of the In Vitro Degradation of a Novel Polylactide/Nanohydroxyapatite Composite for Artificial Bone", *Journal of Nanomaterials*, Volume 2013, Article ID 515741, 10 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/515741>
- [184] Y.S. Liu, Q.L. Huang, A. Kienzle, W.E.G. Müller, Q.L. Feng, "In vitro degradation of porous PLLA/pearl powder composite scaffolds", *Materials Science and Engineering C* 38 (2014) 227–234.
- [185] L.A. Gaona, J.L. Gómez Ribelles, Jairo E. Perilla, M. Lebourg, Hydrolytic degradation of PLLA/PCL microporous membranes prepared by freeze extraction, *Polym. Degrad. Stab.* 97 (2012) 1621–1632.
- [186] H. Pistner, R. Gutwald, R. Ordnung, J. Reutther, "Poly (L-Lactide):A Long-Term Degradation Study In Vivo", *Biomaterials*, 14, N°9, p.671-677, (1992).
- [187] E.A.R. Duek, C.A.C. Zavaglia, W.D. Belangero, "In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation", *Polymer* 40 (1999) 6465–6473.
- [188] Y. Kang, Y. Yao, G. Yin, Z. Huang, X. Liao, X. Xu, G. Zhao, "A study on the in vitro degradation properties of poly(l-lactic acid)/□-tricalcium phosphate(PLLA/□-TCP) scaffold under dynamic loading", *Medical Engineering & Physics* 31 (2009) 589–594.

- [189] S. M. Davachi, B. Kaffashi, B. Torabinejad, A. Zamanian "In-vitro investigation and hydrolytic degradation of antibacterial nanocomposites based on PLLA/triclosan/nano-hydroxyapatite", *Polymer*, 2016 .
- [190] H. Deplaine, V. A. Acosta-Santamaría, A. Vidaurre, J. L. Gómez Ribelles, M. Doblaré, I. Ochoa, G. Gallego Ferrer, "Evolution of the properties of a poly(l-lactic acid) scaffold with double porosity during in vitro degradation in a phosphate-buffered saline solution ", *J. Appl. Polym. Sci.* 2014, 131, 40956.
- [191] C. Schugens, V. Maquet, C. Grandfils, R. Jerome, and P. Teyssie, "Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation". *J.Biomed.Mater.Res.* 30, (1996b), 449-461.
- [192] Y. H. Hu, D. W. Grainger, S.R. Winn, and J.O. Hollinger, "Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems", *J.Biomed.Mater.Res.* 59, (2002), 563-572.
- [193] R. Zhang, P. X. Ma," Porous poly(l-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process", *J Biomed Mater Res* 1999; 45:285-93
- [194] H. Zhao, K. Saatchi, U. O. Häfeli, *J. Magn. Magn. Mater.* 2009, 321, 1356–1363.
- [195] K. H. Chiu, K. L. Ou, S. Y. Lee, C. T. Lin, W. J. Chang WJ, C. H. Chen, H. M. Huang, *Ann. Biomed. Eng.* 2007, 35, 1932–1939.
- [196] H. M. Huang, S. Y. Lee, W. C. Yao, C. T. Lin, C. T. Yeh, *Clin. Orthop. Rel. Res.* 2006, 447, 201–208.
- [197] E. Shimizu, Y. Matsuda-Honjyo, H. Samoto, R. Saito, Y. Nakajima, Y. Nakayama, N. Kato, M. Yamazaki, Y. Ogata,. *J. Cell. Biochem.* 2004, 91, 1183–1196.
- [198] Y. Yamamoto, Y. Ohsaki, T. Goto, A. Nakasima, T. Iijima, *J. Dent. Res.* 2003, 82, 962–966.
- [199] G. Sui, X. Yang, F. Mei, X. Hu, G. Chen, X. Deng, et al., "Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration", *J. Biomed. Mater. Res. A* 82 (2007) 445e454.
- [200] Y. Nishida, R. Domura, R. Sakai, M. Okamoto, S. Arakawa, R. Ishiki, M. R. Salick, L.S. Turng, "Fabrication of PLLA/HA composite scaffolds modified by DNA", *Polymer* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2014.09.063>.
- [201] H. Tanaka, T. Araki," Phase inversion during viscoelastic phase separation: Roles of bulk and shear relaxation moduli", *Physical Review Letters* 1997; 78(26):4966-4969.
- [202] C. L. Jackson and M. T. Shaw, "The phase behaviour and gelation of a rod-like polymer in solution and implications for microcellular foam morphology," *Polymer*, 31, 1070-1083 (1990).
- [203] K. A. Athanasiou, J.P. Schmitz, C. M. Agrawal."The effects of porosity on degradation of PLA-PGA implants". *Tissue Eng* 1998; 4:53-63.
- [204] C. M. Agrawal , J.S. McKinney, D. Lanctot, K.A. Athanasiou, "Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering", *Biomaterials.* 2000 Dec; 21(23):2443-52.
- [205] K.H. Lam KH, P. Nieuwenhuis, I. Molenaar, H. Esselbrugge, J. Feijen, P.J. Dijkstra, J.M. Schakenraad, "Biodegradation of porous versus non-porous poly(L-lactic acid) films", *J Mater Sci* 1994;5(4):181-9.
- [206] T. Kokubo, H. Takadama,"Howuseful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity", *Biomaterials* 2006; 27:2907–15.
- [207] Kister G, Cassanas G, Vert M. Effects of morphology, conformation and configuration on the IR and Raman spectra of various poly(lactic acid)s. *Polymer.* 1998; 39(2):267–73.
- [208] S. Zhou, X. Zheng, X. Yu, J. Wang, J. Weng, X. Li, B. Feng, and M. Yin, "Hydrogen Bonding Interaction of Poly(D,L-Lactide)/hydroxyapatite Nanocomposites", *Chem. Mater.* 2007, 19, 247-253
- [209] M. Partini, R. Pantani, "FTIR analysis of hydrolysis in aliphatic polyesters", *Polymer Degradation and Stability* 92 (2007) 1491-1497.
- [210] G.W.H. Hohne, "Another approach to the Gibbs–Thomson equation and the melting point of polymers and oligomers". *Polymer*, 2002. 43: p. 4689–4698.
- [211] "Biodegradable Polymers, Medical Applications", *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Son. Vol. 5. (2005).

- [212] H. Tsuji, A. Mizuno, Y. Ikada, *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 77, 1452.
- [213] F. Zuluaga, "Algunas aplicaciones del ácido poli-L-láctico". *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 37 (142): 125-142, 2013. ISSN 0370-3908.]
- [214] Tesis Doctoral de Belén Fernández-Montes Moraleda, "Optimización de materiales para regeneración ósea. Estudio de las interacciones de hidroxiapatita con proteínas y preparación de andamios porosos.", Universidad Complutense de Madrid, 2013.
- [215] M. Kikuchi, Y. Koyama, K. Takakuda, H. Miyairi, N. Shirahama, J. Takana, "J. In vitro change in mechanical strength of b-tricalcium phosphate/copolymerized poly-L-lactide composites and their application for guided bone regeneration", *J Biomed Mater Res* 2002; 62:265-72.
- [216] M. Kikuchi, Y. Koyama, T. Yamada, Y. Imamura, T. Okada, N. Shirahama, et al., "Development of guided bone regeneration membranecomposed of b-tricalciumphosphate and poly (L-lactideco-glycolide-co-3-caprolactone) Composites". *Biomaterials* 2004; 25: 5979-86.
- [217] V. Mellon, S. Best, R. Cameron, W. Bonfield, "Degradation of composite scaffolds of poly(D,L, lactic-co-glycolic acid) and tricalcium phosphate", 18th European conference on biomaterials, Stuttgart, Germany; 1-4 October 2003. p. T058.
- [218] M. Hakkarainen, A. Albertsson, S. Karlsson, *Polym. Degrad. Stab.* 1996, 52, 283.
- [219] X. Zhang, M. Espiritu, A. Bilyk, L. Kurniawan, *Polym. Degrad. Stab.* 2008, 93, 1964.
- [220] S. Shyam Roy, 2003, "Synthesis of Biodegradable Poly (Lactic Acid) Polymers", Ph.D. Thesis, Poona (India): University of Poona.
- [221] D. M. Huang, J.K. Hsiao, Y.C. Chen, L. Y. Chien, M. Yao , Yin-Kai Chen c, Bor-Sheng Ko c, Szu-Chun Hsu d, Lin-Ai Tai a, Hui-Ying Cheng ,Shih-Wei Wang e, Chung-Shi Yang a, Yao-Chang Chen "The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles", *Biomaterials* 30 (2009) 3645–3651
- [222] D. Shan, Y. Shi, S. Duan, Y. Wei, Q. Cai, X. Yang, "Electrospun magnetic poly(L-lactide) (PLLA) nanofibers by incorporating, PLLA-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles", *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 3498–3505
- [223] A. Nan, R. Turcu, I. Craciunescu, O. Pana, H. Scharf and J. Liebscher, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2009, 47, 5397–5404.
- [224] W. Yuan, J. Yuan, L. Zhou, S. Wu and X. Hong, *Polymer*, 2010, 51, 2540–2547.
- [225] S. A. M. Ali, P. J. Doherty and D. F. Williams. Mechanisms of Polymer Degradation in Implantable Devices. 2. Poly(DL-lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 27, 1409-1418 (1993).
- [226] J. del Río, A. Etxeberria, N. López-Rodríguez, E. Lizundia, JR. Sarasua . A PALS Contribution to the Supramolecular Structure of Poly(L-lactide). *Macromolecules* 2010; 43:4698-4707.
- [227] Sarasua JR, Zuza E, Imaz N, Meaurio E."Crystallinity and Crystalline Confinement of the Amorphous Phase in Polylactides", *Macromol Symp.* 2008; 272:81-86.
- [228] A. Larrañaga, J.R. Sarasua, "Effect of bioactive glass particles on the thermal degradation behaviour of medical polyesters", *Polym. Degrad. Stab.* 98 (2013),751–758.
- [229] N. Rescignano, Y. Gonzalez-Alfaro, E. Fantechi, M. Mannini, C. Innocenti ,E. Ruiz-Hitzky, J.M. Kenny, I. Armentano , "Design, development and characterization of a nanomagnetic system based on iron oxide nanoparticles encapsulated in PLLA-nanospheres", *European Polymer Journal* 62 (2015) 145- 154.
- [230] Ge J, Hu Y, Biasini M, Beyermann WP, Yin Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007, 46, 4342–4345.
- [231] Y. H. Pan, H. T. Wang, T. L. Wu, K. H. Fan, H. M. Huang, W. J. Chang, "Fabrication of Fe₃O₄/PLLA Composites for Use in Bone Tissue Engineering", *Polymer Composites*, 2016, DOI 10.1002/pc
- [232] A. Yeo, B. Rai, E. Sju, J. Cheong, S. Teoh, "The degradation profile of novel, bioresorbable PCL-TCP scaffolds: an in vitro and in vivo study", *J Biomed Mater Res A* 2008;84:208-18.
- [233] H. Liu, L. Zhang, J. Li , Q. Zou , Y. Zuo , W. Tian & Y. Li, "Physicochemical and Biological Properties of Nano-hydroxyapatite-Reinforced Aliphatic Polyurethanes Membranes", *Journal of*

Biomaterials Science, Polymer Edition, (2010),21:12, 1619-1636, DOI: 10.1163/092050609X12524778957011

[234] Q. Guo, G. Groeninckx, "Crystallization kinetics of poly(ϵ -caprolactone) in miscible thermosetting polymer blends of epoxy resin and poly(ϵ -caprolactone)", *Polymer*, 42, 8647-8655, 2001. 3.

[235] Z. Qiu Z., M. Komura, T. Ikehara, T. Nishi, "Miscibility and crystallization behavior of biodegradable blends of two aliphatic polyesters. Poly(butylene succinate) and Poly(ϵ -caprolactona)" *Polymer*, 44, 7749-7756, 2003.

[236] D. Cam, S. H. Hyon, Y. Ikada, "Degradation of high molecular weight poly (L-lactide) in alkaline medium", *Biomaterials*, 16, 833-843, 1995.

[237] N. A. Weir, F. J. Buchanan, J. F. Orr, D. F. Farrar, A. Boyd, "Processing annealing and sterilization of poly-L-lactide", *Biomaterials*, 25, 3939-3949, 2005.

[238] Melania Monti; Apuntes técnicas de separación cromatográfica. <http://www.slideshare.net/melaniamonti7/apuntes-tecnicas-deseparacioncromatografica>