

7. ANEXOS

7.1. Resultados del ensayo de magnetización.

Este ensayo se llevó a cabo para obtener el parámetro M_s tanto en el caso de las nanopartículas magnéticas como en el de las microesferas cargadas con dichas MNPs. En el caso de la medida realizada con las nanopartículas se obtuvo un valor de $M_s = 57.98$ emu/g. La Figura 24 se corresponde con la gráfica de *hysteresis loop* de dicha muestra.

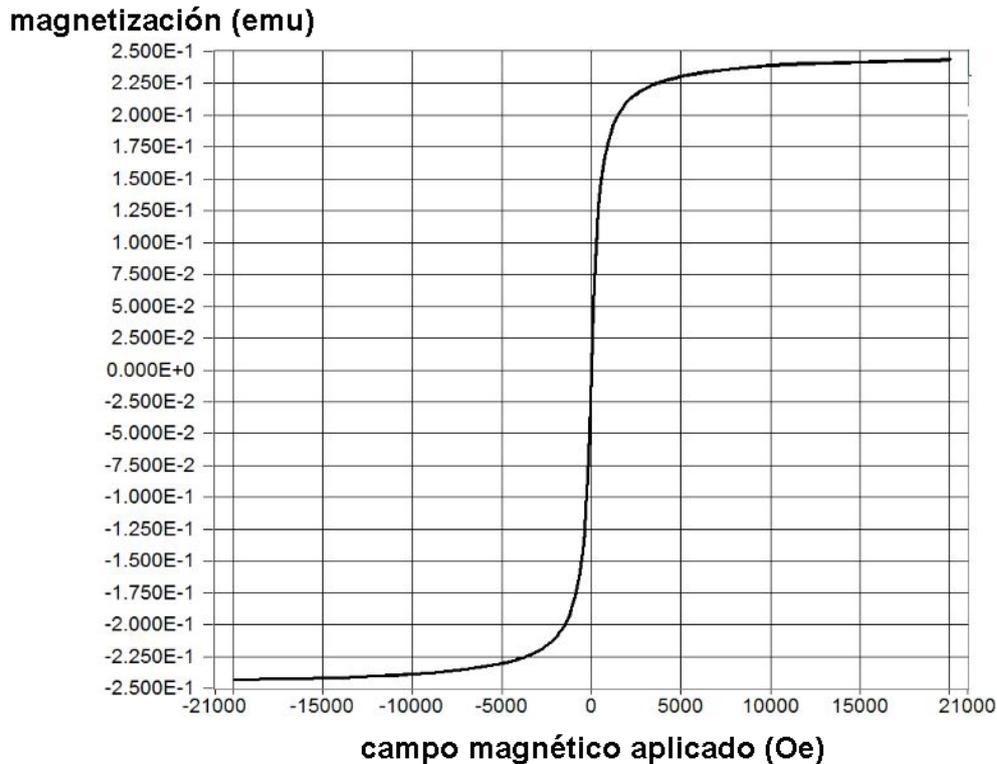


Figura 24. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para las MNPs de ferrita.

En cambio, para las microesferas con MNP se obtuvo un valor medio de $M_s = 1.38$ emu/g para las dos medidas realizadas. En las Figuras 25 y 26 se presentan las correspondientes gráficas.

magnetización (emu)

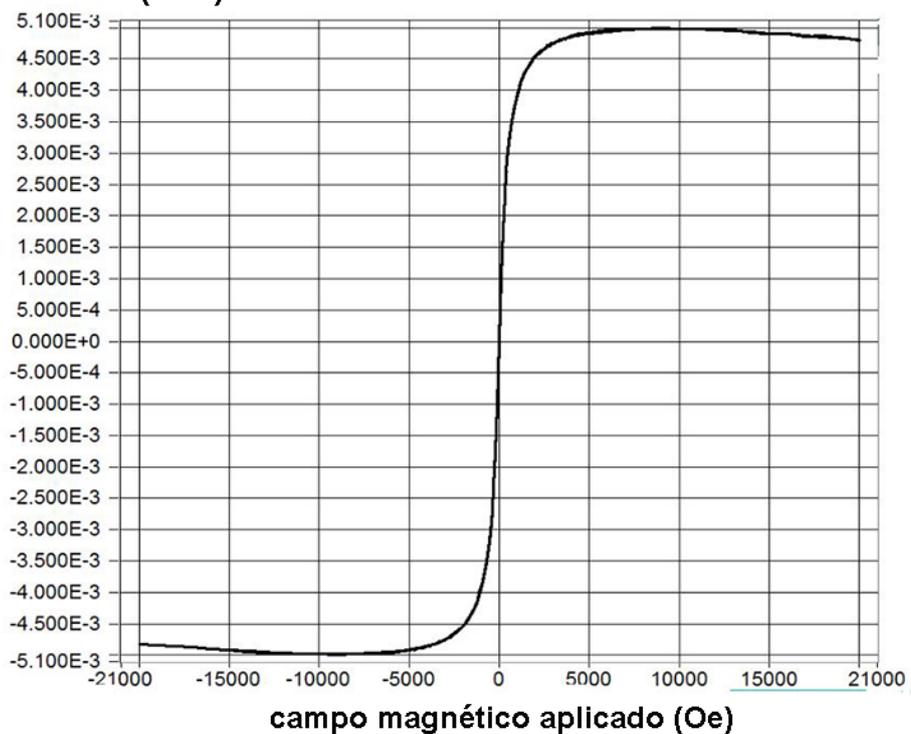


Figura 25. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para la primera réplica de microesferas magnéticas.

magnetización (emu)

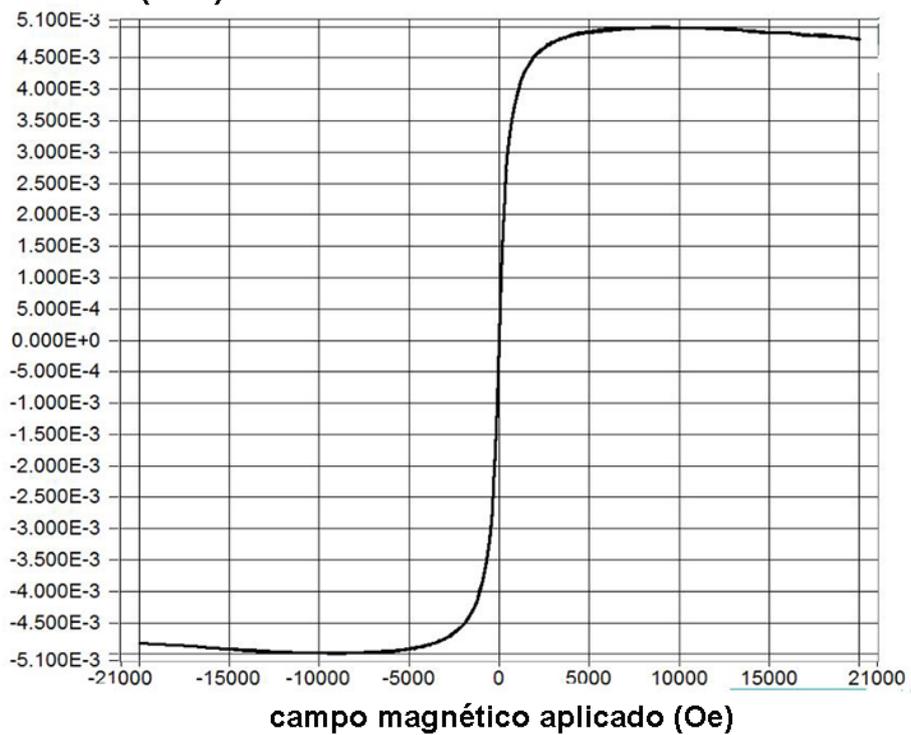


Figura 26. Gráfica obtenida mediante el ensayo de VSM para la segunda réplica de microesferas magnéticas.

Teniendo en cuenta que si la concentración real de nanopartículas en las microesferas fuera del 5% (concentración a la que se prepararon las disoluciones de nanopartículas empleadas para la fabricación de las microesferas) éstas deberían presentar un M_s teórico = 2.9 emu/g; se pudo establecer que la concentración real de ferrita en las microesferas era del 2.38%. Lo que suponía una eficacia en el proceso de carga de las nanopartículas en las microesferas del 47.7%.

7.2. Cálculo del grado de injerto y grado de sustitución de la gelatina-TA.

En este apartado se detallan los cálculos realizados para obtener dichos indicadores.

En el caso del **grado de injerto**, expresado como moles de grupos fenol /mg de gelatina, y que se recoge en la Tabla 5 para cada una de las tres síntesis realizadas, se partió del dato de absorbancia a 275 nm obtenido para cada una de las muestras de gelatina-TA. Empleando dicho dato y empleando la recta de calibrado que se muestra en la Figura 27 se obtuvo la concentración de tiramina (mg/mL) para cada una de las muestras (Tabla 6), cuyo valor promedio, 0.03 mg/mL se presenta en el apartado 4.1.2.

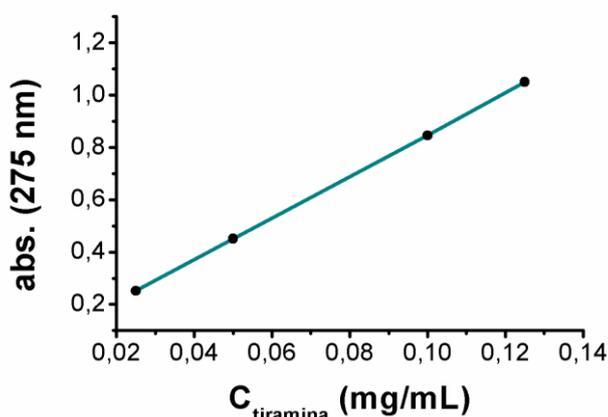


Figura 27. Recta de calibrado para la determinación de la concentración de tiramina (mg/mL). Se representa la absorbancia de las distintas disoluciones patrón de concentración conocida frente a la concentración de tiramina de las mismas. La ecuación de la recta obtenida fue $Y = 8.81X$, y la bondad del ajuste fue $R^2 = 0.99$.

Dado que las disoluciones de gelatina-TA empleadas para obtener dichas medidas tenían una concentración baja, 0.1%, y que fueron preparadas en agua miliQ podemos asumir que la densidad de las mismas es equivalente a la densidad del agua (1 g/mL); de manera que los datos de concentración de tiramina en mg/ml fueron convertidos a mg de tiramina/mg de gelatina empleando dicho valor.

A continuación, empleando el peso molecular de la tiramina que proporciona la ficha del reactivo (137.18 g/mol), se obtuvieron los datos de concentración de tiramina en moles/mg, y teniendo en cuenta que cada molécula de tiramina contiene un único grupo fenol, se puede asumir por tanto que se ha obtenido el valor de concentración de tiramina como moles de grupos fenol / mg de gelatina, que constituye el grado de injerto (Tabla 6).

Tabla 6. Cálculos realizados para la obtención del grado de injerto de las muestras de gelatina-TA.

	1º síntesis	2º síntesis	3º síntesis	Valor promedio	Desviación estándar
Absorbancia a 275nm	0.239	0.236	0.238	0.238	$1.5 \cdot 10^{-4}$
Ctiramina (mg/mL)	0.0298	0.0296	0.0298	0.0297	$1.1 \cdot 10^{-4}$
Ctiramina(moles/mg)	$2.19 \cdot 10^{-7}$	$2.16 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$
Grado de injerto (moles de grupos fenol/mg de gelatina-TA)	$2.19 \cdot 10^{-7}$	$2.16 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$

El **grado de sustitución** en cambio es un porcentaje que representa el número de grupos COOH de la gelatina que han reaccionado con grupos NH₂ de la tiramina respecto al total de grupos COOH que podrían haber reaccionado.

El número de grupos COOH de la gelatina se presenta como dato en la ficha técnica del reactivo, de manera que ésta presenta 80 mmoles de grupos COOH/100g.

Es posible determinar la cantidad de grupos COOH de la gelatina que ha reaccionado gracias a la medida de absorbancia a 275 nm de las muestras de gelatina, ya que es equivalente a la cantidad de grupos fenol que ésta ha incorporado puesto que cada grupo COOH que reacciona incorpora un único grupo fenol, de manera que la última fila de la Tabla 6 recoge este dato.

A continuación, los dos datos obtenidos se cambiaron de unidad a moles de grupos COOH/mg de gelatina y se obtuvo el porcentaje que representaban los moles de grupos COOH que habían reaccionado respecto al total de moles de grupos COOH de la gelatina, tal y como se recoge en la Tabla 7, obteniéndose así los datos de grado de sustitución que se presentan en la Tabla 5 del apartado 4.1.2.

Tabla 7. Cálculos realizados para la obtención del grado de sustitución de las muestras de gelatina-TA.

	1º síntesis	2º síntesis	3º síntesis	Valor promedio	Desviación estándar
Moles de COOH/mg de gelatina-TA	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$	$0.8 \cdot 10^{-6}$	0.0
Moles de COOH que han reaccionado/mg de gelatina-TA	$2.19 \cdot 10^{-7}$	$2.16 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$2.18 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$
Grado de sustitución (%)	27.35	27.00	27.23	27.19	0.17

7.3. Análisis de los resultados obtenidos mediante medidas reológicas.

Como se establece en el apartado 4.1.2, es posible determinar el tiempo de gelificación del hidrogel a partir de la dinámica de gelificación del mismo, representada como el avance del módulo elástico (G') en función del tiempo, dado que el tiempo de gelificación se define como el punto de corte entre la recta que permite obtener un buen ajuste lineal para tiempos cortos del ensayo y la que permite obtener un buen ajuste lineal para tiempos largos (Poveda-Reyes *et al.*, 2016).

En la Figura 28, se muestra dicha representación y se presenta acompañada de los ajustes lineales realizados y del punto de corte obtenido entre ambos. Se recogen también los parámetros de los mismos en la Tabla 8.

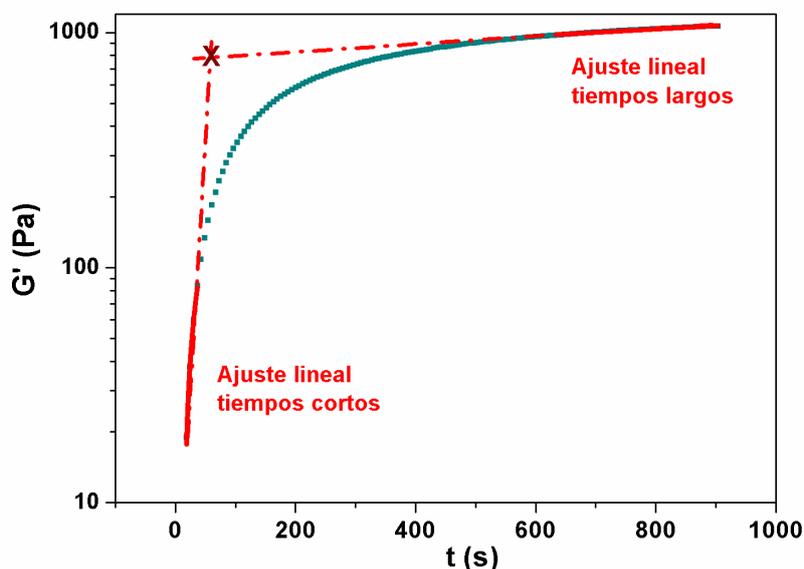


Figura 28. Módulo de almacenamiento en función del tiempo para un hidrogel de gelatina-TA3% con representación del cálculo del tiempo de gelificación. Se muestra el ajuste lineal correspondiente a los tiempos iniciales y finales de la dinámica de gelificación en color rojo, así como el tiempo de gelificación (punto de corte entre ambas rectas) en color granate.

Tabla 8. Parámetros correspondientes a las rectas de ajuste lineal de la Figura 28.

Ajuste lineal a tiempos cortos	Ecuación	$Y = 3.6X - 47.6$
	Bondad del ajuste	$R^2 = 0.99$
Ajuste lineal a tiempos largos	Ecuación	$Y = 0.34X + 766.7$
	Bondad del ajuste	$R^2 = 0.99$
Punto de corte (tiempo de gelificación)		247.07 (s)

Además del ensayo de gelificación, se realizaron barridos de amplitud y barridos de frecuencia.

En el caso del barrido de amplitud se obtuvo la gráfica que se muestra en la Figura 29, en la que se representa el módulo complejo (G^*) del material en función del *strain* aplicado en el ensayo. Dicho módulo es el módulo del vector obtenido como suma de las contribuciones de los módulos de almacenamiento (G'), que está asociado con la energía almacenada en el material, y de pérdidas (G''), asociado con la energía disipada por el material.

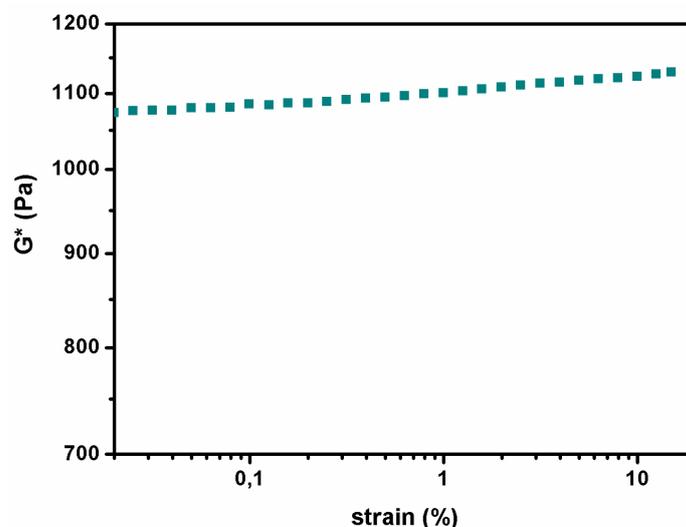


Figura 29. Evolución del módulo complejo en función del *strain* aplicado a la muestra para un hidrogel de gelatina-TA3%.

Por último, en el caso de los barridos de frecuencia, se obtuvieron datos del módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdidas (G'') y la tangente de δ ($\tan \delta$), donde δ representa el desfase entre esfuerzo y deformación, por lo que es un parámetro informativo de la relación entre la energía disipada y la almacenada por el material y de la viscosidad del mismo. Las medidas, representadas en la Figura 30, se realizaron de un intervalo de frecuencia de 0.1 a 10 Hz.

Se puede apreciar como en los tres casos se produce un aumento de la variable dependiente al aumentar la frecuencia, al menos para valores de frecuencia superiores a 2 Hz.

Para un valor dado de frecuencia de 1 Hz, los valores de G' , G'' y $\tan \delta$ se muestran en la Tabla 9. En ella se puede apreciar que la contribución al módulo complejo G^* del módulo de almacenamiento de cizalla es mucho mayor que la del módulo de pérdidas, dado que $G' \gg G''$ lo cual indica que el material presenta un comportamiento elástico, coincidiendo con los resultados obtenidos por Poveda-Reyes *et al.* (2015).

Tabla 9. Módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdidas (G'') y tangente de δ ($\tan \delta$) obtenidos para una frecuencia de 1Hz, aplicando un 1% de *strain* y a una temperatura de 37° para la gelatina-TA3%.

Muestra	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan(\delta)$
Gelatina-TA3%	1132.92	0.887	$7.74 \cdot 10^{-4}$

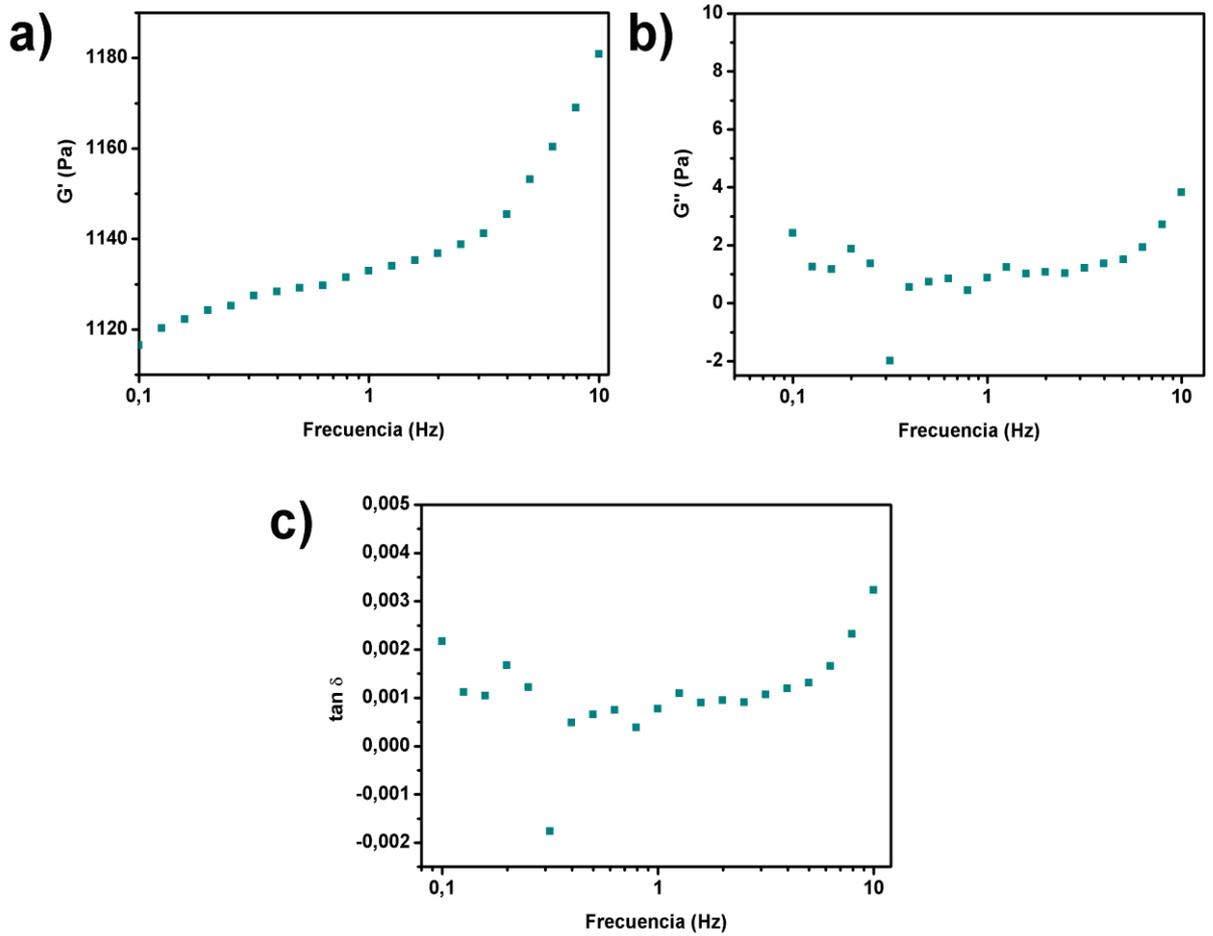


Figura 30. Evolución del módulo de almacenamiento (a), del módulo de pérdidas (b) y la tangente de δ (c) en función de la frecuencia, para hidrogeles de gelatina-TA3%.

7.4. Resultados del análisis estadístico del ensayo de MTS.

Se muestra a continuación la Tabla 10, que recoge los resultados del análisis estadístico realizado con los datos de absorbancia obtenidos en el ensayo de MTS, al que se hace referencia en el apartado 4.2.2.

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples realizado mediante el software GraphPad Prism 7. En ella se muestran si existen o no diferencias significativas para cada una de las condiciones y tiempos ensayados. El término Neat particles se refiere a la matriz con esferas control de PLLA, mientras que el término Magnetic Particles hace referencia a la matriz con esferas con MNPs de ferrita.

Number of families	1		
Number of comparisons per family	15		
Alpha	0,05		
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?
Magnetic particles:1 day vs. Magnetic particles:3 days	-0,2564	-0,382 to -0,1308	Yes
Magnetic particles:1 day vs. Magnetic particles:7 days	-1,12	-1,256 to -0,9845	Yes
Magnetic particles:1 day vs. Neat particles:1 day	0,008	-0,1176 to 0,1336	No
Magnetic particles:1 day vs. Neat particles:3 days	-0,2004	-0,326 to -0,07478	Yes
Magnetic particles:1 day vs. Neat particles:7 days	-1,121	-1,246 to -0,9949	Yes
Magnetic particles:3 days vs. Magnetic particles:7 days	-0,8638	-0,9994 to -0,7282	Yes
Magnetic particles:3 days vs. Neat particles:1 day	0,2644	0,1388 to 0,39	Yes
Magnetic particles:3 days vs. Neat particles:3 days	0,056	-0,06959 to 0,1816	No
Magnetic particles:3 days vs. Neat particles:7 days	-0,8641	-0,9897 to -0,7385	Yes
Magnetic particles:7 days vs. Neat particles:1 day	1,128	0,9925 to 1,264	Yes
Magnetic particles:7 days vs. Neat particles:3 days	0,9198	0,7842 to 1,055	Yes
Magnetic particles:7 days vs. Neat particles:7 days	-0,00033	-0,136 to 0,1353	No
Neat particles:1 day vs. Neat particles:3 days	-0,2084	-0,334 to -0,08278	Yes
Neat particles:1 day vs. Neat particles:7 days	-1,129	-1,254 to -1,003	Yes
Neat particles:3 days vs. Neat particles:7 days	-0,9201	-1,046 to -0,7945	Yes