

# NANOKOMPOZYT POLY( $\epsilon$ -KAPROLAKTON)/TLENKI ŻELAZA DLA ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

MAŁGORZATA ŚWIĘTEK<sup>1\*</sup>, JUSTYNA GWIZDAŁA<sup>1</sup>,  
WALDEMAR TOKARZ<sup>2</sup>, ELŻBIETA MENASZEK<sup>3</sup>, MARTA BŁAŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, Wydział Inżynierii  
MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

<sup>2</sup> AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, Wydział FIZYKI  
I INFORMATYKI STOSOWANEJ, KATEDRA FIZYKI CIAŁA STAŁEGO,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

<sup>3</sup> UNIWERSYTET JAGIELLONSKI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY  
COLLEGIUM MEDICUM, ZAKŁAD CYTOBIOLOGII,  
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW

\*E-MAIL: SWIETEK@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

*Nanokompozyty polimerowe stanowią szeroką grupę materiałów znajdujących zastosowanie zarówno w wielu gałęziach przemysłu, jak i w medycynie. Fenomen nanokompozytów związany jest z łatwością modyfikacji ich cech materiałowych będących pochodną właściwości zarówno samego polimeru, jak i zastosowanego nanododatku. Pozwala to na projektowanie oraz wytwarzanie materiałów o określonej charakterystyce, adresowanych do konkretnych potrzeb.*

*Celem niniejszej pracy było otrzymanie oraz charakterystyka polimerowych nanokompozytów o właściwościach magnetycznych. Jako osnowę polimerową wykorzystano biozgodny i bioresorbowały poli( $\epsilon$ -kaprolakton), do którego wprowadzono cząstki magnetytu znajdującej się w dyspersji nanometrycznej. Do przygotowania materiałów zastosowano prostą metodę odlewania filmu/odparowania rozpuszczalnika. W celu zbadania wpływu zawartości nanododatku na właściwości nanokompozytu przygotowano serię materiałów różniących się od siebie ilością wprowadzonych do matrycy polimerowej cząstek magnetycznych (0; 0,5; 1 oraz 2%). Charakterystyka nanokompozytów obejmowała badania własności magnetycznych i powierzchniowych materiałów oraz ocenę ich degradacji oraz biozgodności. Pętle histerezy wprowadzonego do matrycy polimerowej nanododatku oraz otrzymanych nanokompozytów wykazywały przebieg typowy dla multidomenowych materiałów ferrimagnetycznych. Zaobserwowano, że istnieje korelacja pomiędzy wartością namagnesowania nasycenia oraz remanencją, a zawartością cząstek magnetycznych w nanokompozycie. Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że część wprowadzonych cząstek magnetycznych ulega aglomeracji, reszta zaś pozostaje w dyspersji nanometrycznej. Wytworzone materiały nie wykazały toksycznego wpływu na komórki (Normal Human Osteoblast), co pozwala sądzić, że otrzymane nanokompozyty mogłyby zostać wykorzystane w medycynie.*

**Słowa kluczowe:** magnetyczne nanokompozyty, polimery, magnetyt, cząstki magnetyczne

[Inżynieria Biomateriałów 127 (2014) 22-32]

# POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE)/IRON OXIDES NANOCOMPOSITE FOR MEDICAL APPLICATIONS

MAŁGORZATA ŚWIĘTEK<sup>1\*</sup>, JUSTYNA GWIZDAŁA<sup>1</sup>,  
WALDEMAR TOKARZ<sup>2</sup>, ELŻBIETA MENASZEK<sup>3</sup>, MARTA BŁAŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

<sup>2</sup> AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF PHYSICS AND APPLIED COMPUTER SCIENCE,  
DEPARTMENT OF SOLID STATE PHYSICS,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

<sup>3</sup> JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,  
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY,  
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW, POLAND

\*E-MAIL: SWIETEK@AGH.EDU.PL

## Abstract

*Polymer nanocomposites are a wide group of materials which have applications in many branches of industry as well as in medicine. The phenomenon of nanocomposites is associated with simplicity of modification of their features, which are derived from properties of both the polymer matrix and the nanoadditive. This property enables to design and fabricate materials with strictly defined characteristics, addressed to specific needs.*

*The aim of the presented studies was fabrication and characterization of polymer nanocomposites with magnetic properties. As a polymer matrix, a biocompatible and bioresorbable poly( $\epsilon$ -caprolactone) was used. Magnetite powder with nanometer-sized grain fraction was introduced into the polymer matrix as a magnetic nanoadditive. As a fabrication method casting film/solvent evaporation was applied. In order to examine how amount of magnetic nanoadditive influences the properties of nanocomposites, the series of materials with various concentrations of magnetic particles was prepared (0, 0.5, 1 and 2%). Characterization of materials included magnetic and surface properties investigations as well as evaluation of degradability, and biocompatibility of the fabricated materials. Magnetic hysteresis loops of both the nanoadditive itself and the nanocomposite demonstrate curves typical for multi-domain ferrimagnetic materials. Existence of the correlation between the values of magnetic saturation and remanence, and the content of magnetic particles has been observed. Microscopic evaluations have shown that small part of magnetic particles has tendency to agglomerate but the rest remains in nanometric dispersion. For the fabricated materials no cytotoxic influence on the cells was observed (Normal Human Osteoblast). This suggests that obtained nanocomposites could find application in medicine.*

**Keywords:** magnetic nanocomposites, polymer, magnetite, magnetic particles

[Engineering of Biomaterials 127 (2014) 22-32]

## Wprowadzenie

Szybki rozwój nanotechnologii, obserwowany na przestrzeni kilku ostatnich dekad sprawił, że nanomateriały stały się nieodłączoną częścią życia współczesnego człowieka. Zdobycze nanotechnologii wykorzystywane są m.in. w przemyśle motoryzacyjnym, energetycznym, żywieniowym, a także do produkcji nowoczesnych urządzeń elektronicznych zwiększaając ich wydajność oraz w znacznym stopniu obniżając koszty produkcji [1-2]. Zgodnie z definicją o obiekcie w skali nano możemy mówić gdy przynajmniej jeden z jego wymiarów mieści się w zakresie pomiędzy 1-100 nm. Niewielkie rozmiary oraz wysoki stosunek powierzchni do objętości w przypadku nanomaterialów powodują, że posiadają one unikatowe właściwości, a także podlegają charakterystycznym dla nich tylko zjawiskom, niewystępującym w przypadku ich odpowiedników w skali mikro- i makroskopowej [3]. Ponadto, pod względem wielkości nanocząstki zbliżone są do makromolekułów biologicznych tj. białek, genów i znaczaco mniejsze od komórek [4]. Z wyżej wymienionych względów nanomateriały cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem w kontekście ich zastosowania w medycynie, a liczba potencjalnych aplikacji i rozwiązań z roku na rok wzrasta. Szczególnym przypadkiem nanocząstek wykorzystywanych w medycynie są nanocząstki o właściwościach magnetycznych. Znajdują one zastosowanie m.in. w zanokowaniu [5-6] i separacji komórek [7-8], leczeniu chorób nowotworowych metodą hipertermii magnetycznej [9-10], jako środki kontrastujące w rezonansie magnetycznym [11] oraz do kontrolowanego dostarczania leków [11-12]. W systemach DDS (Drug Delivery Systems) nanocząstki magnetyczne mogą stanowić zarówno nośniki substancji farmakologicznej, jak i czynniki wspomagające ich efektywne wychwytywanie w miejscach docelowego działania (tzw. Implant Assisted Magnetic Drug Targeting) [13].

W literaturze pojawia się coraz więcej prac dotyczących zastosowania nanocząstek o właściwościach magnetycznych w medycynie regeneracyjnej tkanki kostnej [14-17]. Zgodnie z definicją podaną przez Daar A.S. i Greenwood H. medycyna regeneracyjna stanowi interdyscyplinarny obszar badań i aplikacji klinicznych mających na celu naprawę, zastąpienie oraz regenerację komórek, tkanek i organów w celu przywrócenia ich funkcji upośledzonych, bądź też utraconych w wyniku wad wrodzonych, chorób, schorzeń czy zachodzącego procesu starzenia [18]. Medycyna regeneracyjna łączy w sobie osiągnięcia takich dyscyplin nauki jak inżynieria tkankowa, biologia, genetyka, transplantologia oraz inżynieria materiałowa. Kluczowym elementem zapewniającym prawidłową odbudowę tkanki jest rusztowanie spełniające szereg warunków związanych m.in. z odpowiednim doborem parametrów mechanicznych, kontrolą czasu biodegradacji, a także biomimetyzmem strukturalnym [19-22]. Czynniki te są szczególnie istotne w odniesieniu do regeneracji tkanki kostnej w przypadku, której jedynie proces odbudowy przebiegający w optymalnie dobranych warunkach umożliwia odbudowę kości zdolnej do całkowitego przejęcia swych naturalnych funkcji po biodegradacji podłożu. Odbudowa tkanki kostnej może być wspomagana nie tylko poprzez zastosowanie odpowiednio dobranych materiałów, lecz także w wyniku oddziaływanie z zewnętrznym, statycznym polem magnetycznym [26-27]. Z tego względu modyfikacja cząstками magnetycznymi bioresorbownej matrycy polimerowej wydaje się być obiecującym krokiem naprzód w celutworzenia wielofunkcyjnego, biomimetycznego podłoża do regeneracji tkanki kostnej, którego właściwości i oddziaływanie z otaczającą go tkanką mogłyby być regulowane poprzez zewnętrzne, ścisłe kontrolowane pole magnetyczne.

## Introduction

Fast development of nanotechnology, observed over the last decades, has made nanomaterials inseparable part of modern man's life. Achievements in nanotechnology are used e.g. in automotive, energetic and food industries as well as in production of novel electronic devices, increasing their efficiency and decreasing costs of their production [1-2]. According to the definition, nanoobject possesses at least one dimension in a range between 1-100 nm. Small sizes and high surface/volume ratio yield properties of nanomaterials which are unique and unachievable for their equivalents in micro and macro scale [3]. Furthermore, in respect of their size, nanoparticles are similar to building blocks of biological macromolecules, such as proteins and genes which are significantly smaller than cells [4]. For the above-mentioned reasons, nanomaterials are a subject of an unabated interest in context of their potential application in medicine. This trend finds reflection in constantly growing number of scientific reports, published each year, concerning various aspects of nanomedicine. Among those, special attention should be drawn to nanoparticles with magnetic properties that find numerous potential applications e.g. in cell labeling [5-6] and separation [7-8], magnetic hyperthermia in cancer treatment [9-10], as contrast agents for an MRI [11] or as a drug delivery system [11-12]. In the case of the latter, nanoparticles can serve either as drug carriers or as a component, supporting capture of biologically active substances in targeted place of action (so-called Implant Assisted Magnetic Drug Targeting) [13].

In the literature an increasing number of scientific papers concerning applications of magnetic nanoparticles in bone regenerative medicine is being published [14-17]. According to the definition of Daar A.S. and Greenwood H., regenerative medicine is an interdisciplinary area of research and clinical application, designed to repair, replace or regenerate cells, tissues and organs, in order to restore their functions, which were impaired or lost by birth defects, illnesses, diseases or as an effect of progressive ageing [18]. Regenerative medicine combines achievements of various branches of science, such as tissue engineering, biology, genetics, transplantology or materials engineering. Crucial element, providing correct tissue reconstruction, is a scaffold. It has to meet a number of requirements associated with proper selection of mechanical properties, controlled biodegradation rate and structural biomimetism [19-22]. These factors are particularly important with respect to bone tissue regeneration, since a fully regenerated bone, capable of taking over its natural functions can be formed only if optimal conditions are met. Bone tissue regeneration may be supported either by selecting proper materials for the production of scaffold, or, as many studies suggest, by interacting with external static magnetic field [26-27]. For this reason, a bioresorbable polymer matrix, modified with magnetic particles seems to be a promising step forward in fabricating multifunctional, biomimetic scaffolds for bone tissue regeneration. Its properties and interactions with surrounding tissues could be regulated by strictly controlled external magnetic field.

Do otrzymywania magnetycznych nanokompozytów polimerowych przeznaczonych dla medycyny regeneracyjnej tkanki kostnej do tej pory w roli nanododatku wykorzystywano: hydroksyapatyt dotowany jonami żelaza [28] oraz magnetyt ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [14,29-31]. Tlenki żelaza, w szczególności zaś magnetyt ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) oraz magemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), należą do najczęściej wykorzystywanych cząstek magnetycznych dedykowanych zastosowaniom medycznym. Związane jest to przede wszystkim z ich niską toksycznością, stabilnością w warunkach fizjologicznych, wysokim momentem magnetycznym, a także stosunkowo prostą i tanią preparatyką [32].

Celem niniejszej pracy było wytworzenie oraz charakterystyka magnetycznych nanokompozytów polimerowych na bazie bioresorbownego poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu), w których dodatek stanowił magnetyt o nanometrycznej dyspersji cząstek. Nanokompozyty poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  były już wcześniej opisywane w literaturze. Większość tych prac związana jest jednak z otrzymywaniem i charakterystyką nanokompozytów w postaci nano- i mikrocząstek [33-35] oraz trójwymiarowych, porowatych podłoży do regeneracji tkanek z stosunkową dużą zawartością nanocząstek magnetycznych (5-20%) [14,29,31,36]. Obiektem niniejszych badań są nanokompozyty otrzymywane w formie filmów (membran) polimerowych. Wytworzenie nanokompozytu w formie filmu polimerowego pozwala na jego charakterystykę w zakresie zjawisk istotnych z punktu widzenia zastosowań medycznych tj. wpływ nanododatku na parametry powierzchni, szybkość degradacji oraz właściwości mechaniczne materiału. Właściwości powierzchni materiału, przede wszystkim zaś swobodna energia powierzchniowa oraz jej komponenta polarna, są czynnikami decydującymi o właściwości biologicznych materiałów. Filmy stanowiące przedmiot niniejszych badań zawierają trzy różne zawartości nanododatku: 0,5%, 1% oraz 2%. Zgodnie z teorią tworzyw nanokompozytowych, już niewielka ilość nanowypełniacza skutecznie modyfikuje matrycę polimerową.

Polikaprolakton jest znany od dawna biozgodnym i resorbownym polimerem syntetycznym [37]. Oznacza to, że produkty jego degradacji zostają całkowicie wyeliminowane z organizmu poprzez włączenie ich do naturalnie zachodzących w organizmie procesów metabolicznych. Ze względu na to, a także niską temperaturę topnienia oraz dobrą rozpuszczalność polikaprolakton stanowi dobry materiał wyjściowy do wytwarzania różnego rodzaju biomateriałów tj. mikrosfer, cienkich filmów, nanowlókien czy też 3-wymiarowych porowatych podłoży [37-38].

Jak wiadomo kluczowym parametrem w technologii nanokompozytów polimerowych jest odpowiednia dyspersja nanododatku w matrycy polimerowej. W przypadku modyfikacji polimeru nanocząstką magnetyczną, właściwości magnetyczne nanododatku istotnie wpływają na jego dyspersję w matrycy polimerowej. Jak wykazały wcześniejsze badania przeprowadzone przez K. Nowicką nanocząstki magnetyczne tworzą aglomeraty o różnych formach i wielkościach wpływając na właściwości nanokompozytu [39]. Jakkolwiek aglomeracji nanocząstek można zapobiegać poprzez modyfikację ich powierzchni materiałami zarówno organicznymi, jak i nieorganicznymi, w niniejszej pracy wykorzystano „czysty” magnetyt [40].

## Materiały i metody

Jako matrycę polimerową do wytworzenia nanokompozytów wykorzystano biodegradowalny polimer polikaprolakton ( $M_n$  45 000), Sigma-Aldrich. Nanododatek, który stanowiły cząstki magnetytu (tlenku żelaza(II, III)), o rozmiarach <50 nm, pochodził z Sigma-Aldrich. Dichlorometan kupiono w Avantor Performance Materials Poland S.A.

For preparation of a magnetic polymer nanocomposite for bone regenerative medicine, various nanoadditives, such as hydroxyapatite modified with iron ions [28] or magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [14,29-31] were used. Iron oxides, especially magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), belong to the most frequently used magnetic particles in medical applications. It is related to their low toxicity, stability under physiological conditions, high magnetic moment as well as relatively simple and cheap preparation techniques [32].

The aim of this paper was fabrication and characterization of magnetic polymer nanocomposites based on a bioresorbable poly( $\epsilon$ -caprolactone). As a nanoadditive, magnetite with grain size of nanometric dispersion was used. Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanocomposites were previously described in literature, however the majority of these papers are associated with preparation and characterization of nanocomposites in form of nano- or microparticles [33-35] and three-dimensional, porous scaffold with relatively high content of magnetic nanoparticles (between 5-20%) [14,29,31,36]. The subjects of the presented research were nanocomposites in form of polymer films (membranes). Formation of nanocomposite in form of polymer film enables characterization of various features, crucial from the viewpoint of medical applications, such as influence of nanoadditives on: surface parameters, degradation rate or mechanical properties of material. Surface parameters, in particular the value of surface free energy and its polar component, determine biological properties of materials. Films, which are the subject of this research, contain three, different amounts of nanoadditive: 0.5%, 1% and 2%. According to the theory of polymer nanocomposites, minor quantity of a nanofiller may successfully modify properties of a polymer matrix.

Polycaprolactone is a well-known biocompatible and bioresorbable synthetic polymer [37]. It means that degradation products of poly( $\epsilon$ -caprolactone) are completely eliminated from the organism, by being included into metabolic pathways. This feature, together with its low melting temperature and good solubility comprises a good starting material for fabrication of various types and forms biomaterials e.g. microspheres, thin films, nanofibers and three-dimensional porous scaffolds [37-38].

It is known that good dispersion of a nanoadditive within the polymer matrix is a key parameter in technology of polymer nanocomposites. In the case of polymers modified with magnetic particle, magnetic properties of a nanoadditive significantly influence its dispersion within the polymer matrix. As K. Nowicka demonstrated, magnetic nanoparticles form agglomerates with different sizes and shapes, which impact properties of a final nanocomposite [39]. However, to prevent agglomeration of nanoparticles, modification of their surface by organic and inorganic materials can be applied. In this paper pure magnetite was used [40].

## Materials and Methods

A bioresorbable polymer, polycaprolactone ( $M_n$  45 000), Sigma Aldrich, was used as the polymer matrix. The nanoadditive, constituted by magnetite (iron oxide (II,III)), of the size below <50 nm, was obtained from Sigma Aldrich. Dichloromethane was purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A.

Do wytworzenia serii nanokompozytów o różnych zawartościach wagowych nanododatku magnetycznego (0%, 0,5%, 1% oraz 2% względem suchej masy polimeru) wykorzystano metodę odlewania folii/odparowywania rozpuszczalnika. Przygotowano 5% roztwór polimeru w dichlorometanie, który następnie homogenizowano przez 24 godziny. Do roztworu polimeru dodano odpowiednią ilość magnetytu i całość mieszano mechanicznie przez godzinę. Po tym czasie roztwór polimeru odlano na szalkę Petriego i pozostawiono na 24 godziny w temp. pokojowej. W celu usunięcia resztek organicznego rozpuszczalnika przygotowane folie polimerowe suszono przez kolejną dobę w 30°C, w warunkach próżni.

Materiały poddano serii badań mających na celu zarówno ich charakterystykę materiałową, jak i dokonanie ich wstępnej oceny pod kątem zastosowań biologicznych. Obserwacje mikroskopowe wykonano zarówno dla dolnej, znajdującej się od strony szklanego podłożu strony materiałów, jak i górnej. Badania powierzchni obejmowały: obserwacje mikroskopowe przeprowadzone przy użyciu mikroskopu Axiovert 40 CFL firmy Zeiss w kontraście fazowym oraz wyznaczanie swobodnej energii powierzchniowej metodą Owensa-Wedta w oparciu o pomiary kąta zwilżania przeprowadzone za pomocą goniometru SA10MK1 KRUSS. Dla każdego materiału obserwacje mikroskopowe przeprowadzono na trzech próbках pochodzących z różnych części otrzymanego filmu polimerowego. Energia powierzchniowa, z uwzględnieniem składowej dyspersyjnej oraz polarnej, została wyznaczona w oparciu o pomiary zwilżalności wykonane dla wody dejonizowanej oraz diodometanu przeprowadzone jedynie dla dolnej strony materiałów. Wynik końcowy kąta zwilżania jest średnią arytmetyczną dziesięciu pojedynczych pomiarów.

Badania właściwości magnetycznych, w tym określenie parametrów tj. namagnesowanie nasycenia, remanencja oraz pole koercji, przeprowadzono na magnetometrze z wibrującą próbką firmy Lake Shore Cryotronics, Inc w temp. pokojowej.

W celu wstępnej oceny degradacji nanokompozyty inkubowano przez okres 28 dni w wodzie destylowanej w temp. 37°C dokonując co 7 dni pomiarów pH. Ponadto, po zakończeniu inkubacji porównano masę próbek przed i po inkubacji w celu stwierdzenia ewentualnego ubytku masy. Dla przygotowanych kompozytów, zarówno przed jak i po inkubacji, przeprowadzono także testy wytrzymałości na rozciąganie przy użyciu maszyny wytrzymałościowej ZWICK 1435 z oprogramowaniem TestXpert 8.1 w warunkach jednoosiowego rozciągania. Założona prędkość odkształcenia wynosiła 2 mm/min. Wyniki badań wytrzymałościowych stanowią średnią arytmetyczną pięciu niezależnie przeprowadzonych pomiarów dla każdego typu materiału. Analizę statystyczną wyników wykonano w oparciu o metodę t-Studenta. Poziom ufności wynosił 0,95.

Badania wstępne biozgodności dolnej strony przygotowanych materiałów wykonano dla ludzkich osteoblastów NH Ost (Lonza, USA). Z przygotowanego materiału wyjęto krążki o średnicy 1,2 cm pasujące do 24-dokowej płytki hodowlanej (Nunc, Dania). Krążki sterylizowano bezpośrednio przed nałożeniem komórek przez zanurzenie w 70% alkoholu etylowym i naświetlaniu promieniowaniem UV z każdej strony przez 30 min. Komórki hodowano na biomateriałach przez 3 oraz 7 dni. Po tym czasie komórki barwiono oranżem akrydyną przez okres 1 min wprowadzając do dołka hodowlanego 10 µl barwnika o stężeniu 1 mg/ml w medium hodowlanym. Materiały następnie płukano w PBS oraz obserwowano za pomocą mikroskopu OLYMPUS CX41 (Olympus, Japonia) z przystawką fluorescencyjną. Dokumentację fotograficzną przygotowano za pomocą aparatu OLYMPUS E-520.

Method of foil casting/solvent evaporation was applied for the production of a series of nanocomposites with different weight values of the magnetic additive (0%, 0.5%, 1% and 2%) with respect to the dry weight of the polymer). 5% (wt/wt) polymer solution in dichloromethane was prepared, which was next homogenized for 24 hours. Consequently, an appropriate amount of magnetite powder was added to the polymer solution and the whole mixture was stirred for 1 hour. Finally, the solution was cast into a glass Petri dish and kept at a room temperature for 24 hours. Afterwards, the foils were placed in a vacuum dryer, at a temperature of 30°C for 24 h, in order to remove the organic solvent residues.

The obtained materials underwent a series of tests aiming at their material characterization as well as an evaluation of their usability in biological applications. Microscopic examinations of the surfaces of the foils were evaluated for two sides of each sample, i.e. the bottom, remaining in the direct contact with a glass Petri dish and the upper one, remaining in the direct contact with an air, using an optical microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss), operating in a phase contrast mode. For every nanocomposite, observations were conducted on three separate samples deriving from different areas of the polymer film. Surface free energy (basing on Owens-Wendt method) was evaluated basing on wettability contact angle measurements performed using DSA-10 Kruss goniometer. Dispersive and polar components of the surface energy were determined based on the measurements conducted on deionized water and diiodomethane. Each nanocomposite was tested 10 times. The results are expressed as mean values ± standard deviation (SD).

The examinations of the magnetic properties, including the determination of the parameters, i.e. saturation magnetization, remanence and coercivity, were performed with the use of a vibrating sample magnetometer by Lake Shore Cryotronics, Inc., at a room temperature.

For the purpose of a preliminary evaluation of the degradation, the nanocomposites were incubated for the period of 28 days in distilled water at 37°C and the measurements were performed every 7 days. What is more, after the end of the incubation, the masses of the samples from before and after the incubation were compared in order to determine a possible mass loss. For the prepared nanocomposites, both before and after the incubation, tensile strength tests were also conducted with the use of a universal testing machine ZWICK 1435 with the TestXpert 8.1 software, under the conditions of a uniaxial tension. The assumed deformation rate equalled 2 mm/min. The results of a tensile strength test are the arithmetic means of five independent measurements performed for each type of material. The statistical analysis was based on Student's t-test, with confidence intervals of 0.95.

The preliminary examination of the biocompatibility was performed on normal human osteoblasts, NH Ost (Lonza, USA). Circles of 1.2 mm diameter were excised from the nanocomposites placed in the matching 24-well plate (Nunc, Denmark) and sterilized directly before seeding the cells, by immersing in 70% ethyl alcohol and exposing each side of the disks to the UV radiation for 30 min. Cells were cultured directly on biomaterials for 3 and 7 days. After this time, the cells were stained for 1 min with acridine orange dye, using 10 µl of stock per well, with concentration 1 mg/ml of medium. Next, materials were rinsed with PBS and observed with the use of an OLYMPUS CXU1 microscope (Olympus, Japan), equipped with a fluorescence attachment. Microphotographic documentation was prepared using OLYMPUS E-520 camera.

## Wyniki i dyskusja

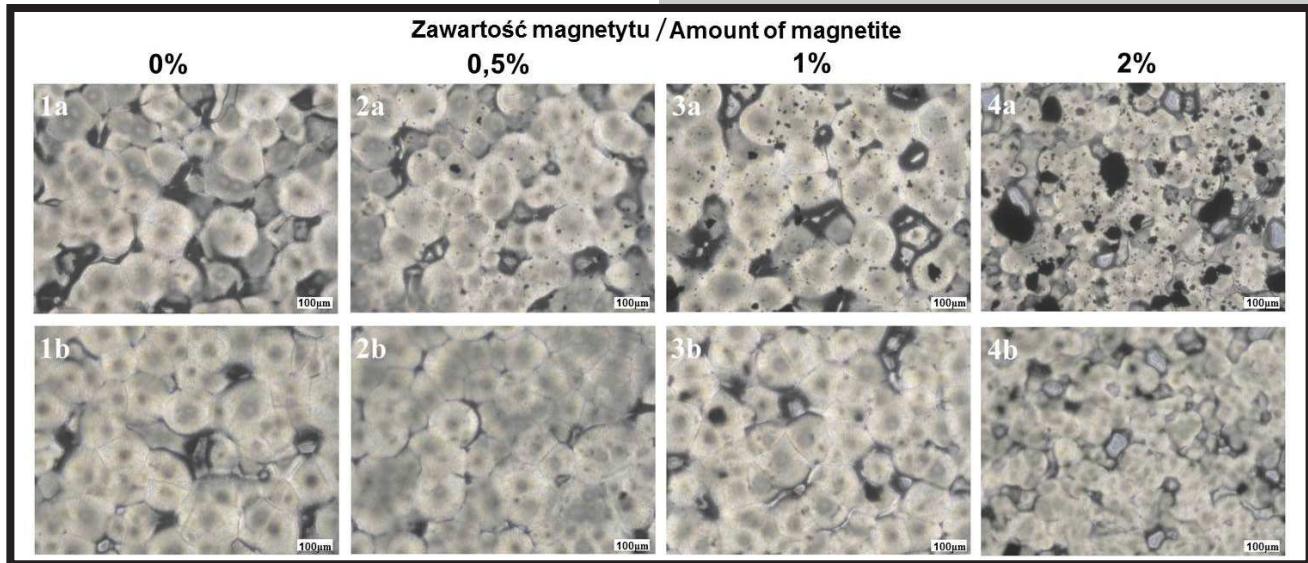
Krystalizacja poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) jest procesem zależnym od szeregu czynników tj.: warunków prowadzenia procesu, masy cząsteczkowej polimeru, rodzaju rozpuszczalnika oraz nanododatku [41-44]. Obserwacje mikroskopowe (RYS. 1) wytworzonych nanokompozytów wskazują, że wprowadzenie do matrycy polimerowej niewielkiej ilości dodatku w postaci cząstek magnetycznych (0,5-1%) nie wpływa znacząco na rozmiar wykryształowanych sferolitów. Sferolity widoczne na mikrofotografiach: folii z czystego polimeru (RYS. 1: 1a, 1b) oraz nanokompozytów z 0,5% i 1% zawartością magnetytu (RYS. 1: 2a, 2b, 3a, 3b) są duże i dobrze wykształcone, a ich rozrost jest limitowany głównie przez wzrost sferolitów znajdujących się w najbliższym otoczeniu. Widoczne na wszystkich mikrofotografiach ciemne obszary zlokalizowane przy granicach sferolitów odpowiadają miejscom, w których nie stykają się one bezpośrednio z innymi sferolitami tworząc puste przestrzenie, stanowiące swego rodzaju „okna”, przez które można obserwować sferolity zlokalizowane w niższych warstwach filmów polimerowych. W porównaniu do folii odniesienia oraz nanokompozytów zawierających niewielką zawartość dodatku, folie z 2% zawartością nanocząstek magnetycznych (RYS. 1: 4a, 4b) charakteryzują się znacząco mniejszymi sferolitami. Co więcej, na podstawie mikrofotografii nie możliwe jest ścisłe wytyczanie granic pomiędzy poszczególnymi sferolitami. Zmniejszenie rozmiarów sferolitów dla nanokompozytów poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu)/magnetyt zostało także zaobserwowane przez Wang G.-S. et al. [44]. Jakkolwiek metody otrzymywania magnetycznych nanokompozytów polimerowych w obu pracach różnią się od siebie (w przypadku publikacji Wang G.-S. et al. zastosowano polimeryzację *in situ*) można przypuszczać, że u podstaw obserwowanej zmiany wielkości sferolitów leżą te same zjawiska. Wprowadzenie do matrycy polimerowej nanododatku jest źródłem heterogenicznej nukleacji krystalizacji poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu), w której nanocząstki magnetyczne lub też ich aglomeraty, stanowią zarodki krystalizacji, co z kolei prowadzi do powstawania licznych, mniejszych sferolitów. Prawdopodobnie w przypadku nanokompozytów o zawartości 0,5 i 1% nanododatku procesy jednorodnej i niejednorodnej nukleacji krystalizacji konkurują ze sobą, jednakże efekt krystalizacji zarodkującej na nanocząstках magnetycznych lub ich aglomeratach, ze względu na ich niewielką ilość, nie jest na tyle istotny, aby wywołać zmiany w morfologii filmów polimerowych.

Dodatek nanocząstek magnetycznych obserwował się w postaci czarnych wtrąceń o różnej wielkości jedynie na dolnej stronie otrzymanych nanokompozytów polimerowych (RYS. 1: 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b). Obecność magnetytu jedynie przy dolnej powierzchni materiałów związana jest z opadaniem stosunkowo ciężkich cząstek/aglomeratów po wylaniu zawiesiny nanocząstek magnetytu w polimerze na szalkę Petriego. Wraz ze zwiększającą się zawartością magnetytu widoczne są coraz większe, przypadkowo zlokalizowane aglomeraty o nieregularnych kształtach. W przypadku folii o najwyższej zawartości nanododatku dominują aglomeraty o rozmiarach rzędu kilku  $\mu\text{m}$  (RYS. 1: 2a), z kolei dla folii zawierającej 1% magnetytu coraz liczniejsze są aglomeraty, których wielkość wynosi pomiędzy 10-30  $\mu\text{m}$  (RYS. 1: 3a). Na mikrofotografiach folii polimerowej o najwyższej zawartości magnetytu (RYS. 1: 4a) widoczne są aglomeraty o wielkości kilku, kilkudziesięciu, a także powyżej 100  $\mu\text{m}$ . Wynika to z faktu, że wraz z rosnącym zagęszczeniem nanocząstek magnetycznych, coraz silniejsze są występujące pomiędzy nimi oddziaływanie powodujące ich wtórną aglomerację, co z kolei prowadzi do heterogenicznej dyspersji nanododatku w obrębie matrycy polimerowej.

## Results and Discussions

Crystallization of poly( $\epsilon$ -caprolactone) depends on a number of factors like process conditions, polymer molecular weight, type of dissolvent and nanofiller [41-44]. The microscopic observations (FIG. 1) of the produced nanocomposites revealed that the introduction of a small amount of the additive in the form of magnetic nanoparticles (0.5-1%) into the polymer matrix does not significantly affect size of the observed spherulites. Spherulites visible in the microphotographs of the film made of pure polymer (FIG. 1: 1a, 1b) and nanocomposites with 0.5% and 1% content of magnetite (FIG. 1: 2a, 2b, 3a, 3b), are large and well-formed. Their growth is mainly limited by growth of spherulites in immediate surroundings. Dark areas visible at the borders of the spherulites are created by the spaces with no immediate contact of the spherulites. These empty spaces serve as a kind of windows through which spherulites located in lower layers of polymer films can be observed. In comparison to the reference film and the nanocomposites contacting a small amount of the nanoadditive, the material with 2% content of magnetic particles (Fig. 1: 4a, 4b) is characterized by significantly smaller spherulites. Furthermore, based only on microphotographs, it is impossible to determine the boundaries. Reduction in spherulites' sizes for nanocomposites poly( $\epsilon$ -caprolactone)/iron oxide were also observed by Wang G.s. et al. [44], where it has been pointed out that the introduction of nanoadditive into polymer matrix is a source of heterogeneous nucleation of crystallization of poly( $\epsilon$ -caprolactone). Magnetic nanoparticles or their agglomerates are nuclei, which lead to creating numerous but smaller spherulites [44]. Although the applied fabrication method is different in both works (in the case of Wang G.S.'s paper *in situ* polymerization method was applied), one can assume that the changes in the spherulites sizes can be explained by the similar phenomena. Probably, in the case of nanocomposites with 0.5% and 1% content of magnetite, homogeneous and heterogeneous nucleation of crystallization compete together but effect of crystallization nucleating on magnetic nanoparticles/agglomerates (because of their small amount) is insignificant to induce changes in the morphology of the polymer films.

The agglomerates of magnetic nanoparticles can be seen in the micrographs in the form of black inclusions (FIG. 1: 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b). Magnetite is observed only on the lower side of the nanocomposites. This can be explained by relatively high weight of the particles, causing their immediate sedimentation after the suspension of magnetite nanoparticles in polymer is being poured into a Petri dish. Together with the increase of the % content of magnetite, one can observe growth of randomly located agglomerates with irregular shapes. In the case of polymer film with the lowest content of nanoadditive, agglomerates with sizes of a few  $\mu\text{m}$  are dominating (FIG. 1: 2a). For the material containing 1% of nanoadditive, the number of agglomerates between 10-30  $\mu\text{m}$  increases (FIG. 1: 3a) and in the case of the material with highest content of the magnetic nanoparticles (FIG. 1: 4a) the sizes of the agglomerates range from several to more than 100  $\mu\text{m}$ . Increasing sizes of the agglomerates can be attributed to greater and stronger interactions between the magnetic nanoparticles, caused by higher density of those. Thus, their secondary agglomeration and heterogeneous dispersion within the polymer matrix can be observed.



**RYS. 1. Mikrofotografie powierzchni filmów polimerowych. Dolna strona: a, górna strona: b.**  
**FIG. 1. Microphotographs of polymer films' surfaces. Bottom side: a, upper side: b.**

Właściwości fizykochemiczne powierzchni biomateriału należą do istotnych czynników wpływających na właściwości biologiczne materiałów implantowanych. Jedną z nich jest swobodna energia powierzchniowa ( $\gamma^{\text{total}}$ ) oraz jej składowa polarna ( $\gamma^P$ ), które bezpośrednio wpływają na adhezję i proliferację osteoblastów [45-47]. Im wyższa jest wartość swobodnej energii powierzchniowej, tym lepsza jest adhezja komórek do podłożka. Z kolei im niższa jest wartość komponenty polarnej, tym niższa jest aktywność proliferacyjna osteoblastów.

Wartości swobodnej energii powierzchniowej oraz jej komponent dla otrzymanych materiałów zamieszczono w TABELI 1. Bazując na danych podanych w literaturze [45-47] można przypuszczać, że najlepsza adhezja komórek będzie obserwowała dla folii polimerowych z czystego poli(ε-kaprolaktonu), nanokompozytu polimerowego z 1%-wą, 0,5%-wą oraz 2%-wą zawartością nanododatku. Należy jednak zwrócić uwagę, że zmiany w wartości swobodnej energii powierzchniowej spowodowane wprowadzeniem nanododatku nie są zbyt duże. Z kolei wartość składowej polarnej obniża się wraz z rosnącą zawartością nanocząstek magnetycznych, a jej prawie 16-krotny spadek obserwowany jest w przypadku nanokompozytu zawierającego 2% magnetytu.

**TABELA 1. Wartości swobodnej energii powierzchniowej ( $\gamma^{\text{total}}$ ) dla materiału odniesienia oraz magnetycznych nanokompozytów z uwzględnieniem składowej dyspersyjnej ( $\gamma^D$ ) oraz składowej polarnej ( $\gamma^P$ ).**

**TABLE 1. Values of the free surface energy ( $\gamma^{\text{total}}$ ) for the film made of pure poly(ε-caprolactone) and the magnetic nanocomposites, including dispersive ( $\gamma^D$ ) and polar ( $\gamma^P$ ) component.**

Zawartość magnetytu Amount of magnetite	$\gamma^{\text{total}}$ [ mN/m ]	$\gamma^D$ [ mN/m ]	$\gamma^P$ [ mN/m ]
0%	$50.48 \pm 1.48$	$44.67 \pm 0.98$	$5.81 \pm 0.50$
0.5%	$45.81 \pm 7.84$	$43.43 \pm 6.79$	$2.40 \pm 1.05$
1%	$47.53 \pm 1.06$	$45.38 \pm 0.87$	$2.14 \pm 0.19$
2%	$43.46 \pm 0.61$	$43.09 \pm 0.51$	$0.37 \pm 0.10$

Physicochemical properties of the surface of the biomaterials are the most important factors determining cell's reaction in contact with the biomaterial. Among many features affecting material's biocompatibility, surface free energy ( $\gamma^{\text{total}}$ ) and its polar ( $\gamma^P$ ) component, have been reported by many studies to have a direct impact on the adhesion and proliferation of the osteoblasts [45-47]. The higher is the value of the surface free energy the better is the adhesion of osteoblasts to the substrate. The smaller is the value of the polar component the lower is the proliferative activity of the osteoblasts.

Values of the surface free energy of the obtained materials are given in TABLE 1. Based on the relations found in the literature [45-47], it can be assumed that the best adhesion of cells should be observed for the polymer film made of pure poly(ε-caprolactone) and nanocomposites with: 1%, 0.5% and 2% content of magnetite. It should be noted that although the changes in the value of the surface free energy, caused by the introduction of the nanoaddition into polymer matrix, are not significant, the value of the polar component of the surface free energy decreases consequently, when the content of nanofiller increases, reaching substantial, nearly 16-fold decrement for the nanocomposite with 2% amount of magnetite. Such drastic changes in the polar component of the surface energy might indicate presence of the nanoadditive also in the form of nanodispersion, consequently interacting with the polymer chains, thus changing structure of the nanocomposites' surfaces.

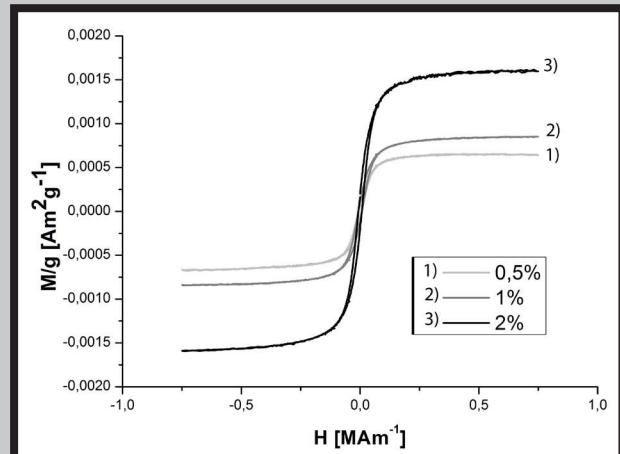
The values of coercivity and remanence (TABLE 2) as well as the shape of the hysteresis loop (FIG. 2) of the nanometric magnetite point to a ferrimagnetic character of both the raw nanoaddition and the prepared nanocomposites. Received values of saturation magnetization for magnetic nanoparticles, referred to as experimental data are found to be close to the literature data for pure magnetite [48-50]. As a result of introducing magnetic particles into the polymer matrix, the value of coercivity remains practically unchanged. The parameters which undergo significant changes are: the magnetic remanence and the saturation magnetization. This is caused by the dependence between the values of both parameters and the density of the magnetic particles, understood as the amount of magnetic particles per unit of volume. Values of the remanence and saturation magnetization were calculated assuming that experimental data obtained for magnetite are 100%. These values are referred to as calculated values in TABLE 2.

**TABELA 2. Parametry magnetyczne magnetytu oraz nanokompozytów.**  
**TABLE 2. Magnetic parameters of magnetite and nanocomposites.**

	Pole koercji Coercive field strength [kAm <sup>-1</sup> ]			Remanencja Remanence [Am <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> ]			Namagnesowanie nasycenia Saturation magnetization [Am <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> ]		
	Zawartość magnetytu Amount of magnetite			Zawartość magnetytu Amount of magnetite			Zawartość magnetytu Amount of magnetite		
	0.5 %	1 %	2 %	0.5 %	1 %	2 %	0.5 %	1 %	2 %
PCL/Magnetyt PCL/Magnetite	87 ± 3	93 ± 1	90 ± 3	0.080 ± 0.003	0.105 ± 0.004	0.193 ± 0.004	0.68 ± 0.06	0.86 ± 0.02	1.65 ± 0.04
Wartość obliczona Calculated Value				0.045	0.091	0.182	0.38	0.76	1.52
Magnetyt Magnetite	94 ± 2			9.1 ± 0.1			76.2 ± 1.3		

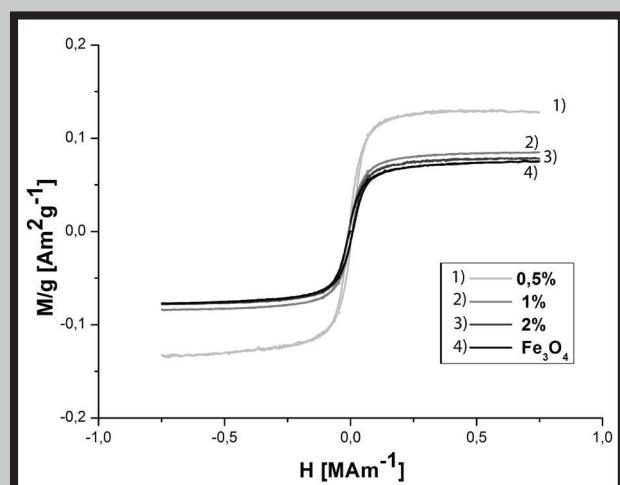
Ponadto zmiany wartości energii swobodnej powierzchni i komponenty polarnej mogą świadczyć o zachodzących zmianach budowy powierzchni, będących konsekwencją oddziaływania łańcuchów polimerowych z nanocząsteczkami magnetytu. Na tej podstawie można przypuszczać, że jakkolwiek na mikrofotografiach obserwowane są różnej wielkości aglomeraty magnetytu, to część nanododatku pozostaje niezagłomerowana, w dyspersji nanometrycznej.

Wartość pola koercji, pozostałości magnetycznej nanometrycznego magnetytu (TABELA 2) oraz kształt pętli histerezy (RYS. 2) wskazują na ferrimagnetyczny charakter zarówno samego nanododatku jak i przygotowanych nanokompozytów polimerowych. Otrzymana wartość namagnesowania nasycenia dla nanocząstek magnetycznych zbliżona jest do wartości podanych w literaturze dla magnetytu [48-50]. Po wprowadzeniu do matrycy polimerowej cząstek magnetycznych wartość pola koercji pozostaje niezmieniona. Parametrami, które w istotny sposób podlegają zmianom są remanencja i namagnesowanie nasycenia. Spowodowane jest to bezpośrednią zależnością pomiędzy wartością obu tych parametrów, a gęstością cząstek magnetycznych rozumianą jako ilość cząstek magnetycznych przypadającą na jednostkę objętości. Ponadto, obliczono wartość remanencji oraz namagnesowania nasycenia przy założeniu, że wartości eksperymentalne otrzymane dla magnetytu stanowią 100% (wartość ta jest oznaczona w TABELI 2, jako „wartość obliczona”). W przypadku nanokompozytów o zawartościach 1 i 2% pomiędzy wartościami teoretycznymi, a eksperymentalnymi nie ma istotnych różnic. Wartości te jednak znacznie od siebie odbiegają dla folii polimerowej o 0,5%-owej zawartości nanododatku. Rozważania te znajdują odzwierciedlenie w pętlach histerezy otrzymanych dla nanokompozytów, w przypadku których namagnesowanie nasycenie zostało przeliczone na masę magnetytu w badanej próbce (RYS. 3). Pętle histerezy dla nanokompozytów 1 i 2% są zbliżone, co do wartości, do pętli histerezy dla nanododatku, natomiast folia polimerowa zawierająca 0,5% nanododatku charakteryzuje się pętlą histerezy o wyraźnie wyższym namagnesowaniu nasycenia. Wartość namagnesowania nasycenia jest pochodną dwóch konkurujących ze sobą oddziaływań: oddziaływań wymienionych oraz dipolowych [51]. Obecność silnych oddziaływań wzajemnych powoduje równolegle porządkowanie się momentów magnetycznych zwiększać wartość namagnesowania nasycenia. Oddziaływanie dipolowe z kolei dążą do antyrównoległego ustawienia momentów magnetycznych obniżając tym samym wartość namagnesowania nasycenia.



**RYS. 2. Pętle histerezy otrzymanych nanokompozytów polimerowych (namagnesowanie nasycenie w przeliczeniu na masę próbki).**

**FIG. 2. Hysteresis loops of fabricated nanocomposites (saturations magnetization calculated through mass of sample).**



**RYS. 3. Pętle histerezy nanododatku (magnetytu) oraz nanokompozytów (namagnesowanie nasycenie przeliczone na masę magnetytu).**

**FIG. 3. Hysteresis loops of nanoaddition and fabricated nanocomposites (saturations magnetization calculated through mass of magnetite).**

Oddziaływanie dipolowe są jednak oddziaływaniami bliskiego zasięgu, co powoduje, że w materiałach o niewielkiej gęstości cząstek (w tym przypadku nanokompozytu o zawartości 0,5% dodatku) nie przeciwdziałają efektywnie oddziaływaniom wymiennym, czego konsekwencją jest wyższa wartość namagnesowania nasycenia niż w przypadku magnetytu oraz nanokompozytów o wyższych zawartościach cząstek magnetycznych. Różnice pomiędzy wartościami eksperymentalnymi a obliczonymi mogą być także spowodowane niejednorodnym rozprowadzeniem nanocząstek magnetycznych w obrębie matrycy, a także występowaniem wzajemnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami magnetycznymi z różnych obszarów folii w kuwecie pomiarowej. Mimo to można stwierdzić, że w przypadku nanokompozytów o wyższej zawartości nanocząstek magnetycznych, wartość namagnesowania nasycenia zmienia się proporcjonalnie do zawartości nanocząstek magnetycznych. Podobną zależność w swojej pracy zaobserwował także Kim J.-J. et al. [31].

Rozważając kształt pętli histerozy (RYS. 3) otrzymanych dla nanododatku oraz magnetycznych folii polimerowych można stwierdzić, że mają one jednakowy przebieg. Wskazuje to na obecność oddziaływań tego samego rodzaju pomiędzy nanocząsteczkami zarówno w magnetycznym proszku, jak i materiałach nanokompozytowych. Sugeruje to, że matryca polimerowa jest jedynie neutralnym nośnikiem dla nanocząstek magnetytu, niewpływającym na ich właściwości magnetyczne.

Przeprowadzona inkubacja w temp. 37°C pozwoliła na wstępne określenie podatności na degradację wytworzonych materiałów nanokompozytów w porównaniu do filmu z poli(ε-kaprolaktonu). Zaobserwowano sukcesywny spadek pH wody destylowanej, w której inkubowano próbki wraz z trwaniem inkubacji (TABELA 3). Dla magnetycznych kompozytów pH wody było nieznacznie niższe w porównaniu do pH wody, w której inkubowano folię wykonaną z czystego polimeru. W wyniku inkubacji nie zaobserwowano znaczącego ubytku masy badanych materiałów (TABELA 4). Różnica pomiędzy masą przed i po inkubacji zbliżona jest do błędu pomiarowego.

**TABELA 3. Wartość pH w czasie trwania inkubacji.**  
**TABLE 3. pH value during the duration of incubation.**

Zawartość magnetytu Amount of magnetite	pH				
	0 dzień 0 days	7 dzień 7 <sup>th</sup> day	14 dzień 14 <sup>th</sup> day	21 dzień 21 <sup>st</sup> day	28 dzień 28 <sup>th</sup> day
0 %	5.79	5.43	4.94	4.86	4.80
0.5%	5.77	5.42	4.68	4.71	4.51
1%	5.77	5.30	4.65	4.56	4.44
2%	5.64	5.27	4.59	4.48	4.36

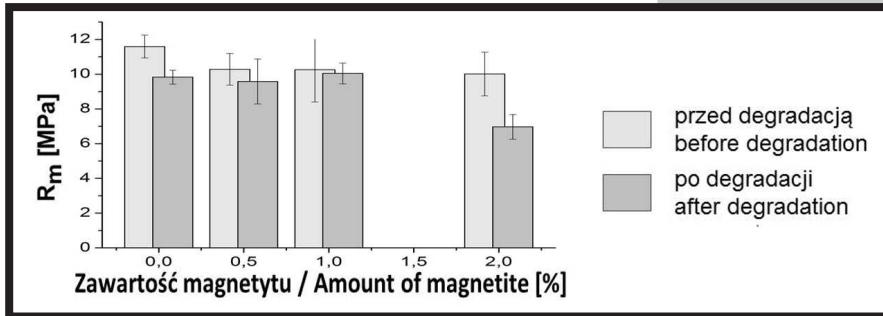
**TABELA 4. Masa próbek przed i po inkubacji.**  
**TABLE 4. Weight of the samples before and after the incubation.**

	Zawartość magnetytu / Amount of magnetite			
	0%		0.5%	1%
	Masa próbki Weight of sample [g]	Masa próbki Weight of sample [g]	Masa próbki Weight of sample [g]	Masa próbki Weight of sample [g]
Przed inkubacją Before incubation	0.185	0.272	0.268	0.272
Po inkubacji After incubation	0.183	0.271	0.266	0.269
Δ	0.002	0.001	0.002	0.003

In the case of nanocomposites with 1% and 2% content of magnetite, there are no significant differences between calculated and experimental data. However, a significant difference in the calculated value can be observed for the polymer film with 0.5% amount of magnetite. These results find reflection in hysteresis loops for fabricated nanocomposites, in which saturation magnetizations were calculated taking into account mass of magnetite in tested sample (FIG. 3). Hysteresis loops for nanocomposites 1 and 2 % are close in value to hysteresis loop of nanoadditive but the polymer film with 0.5% content of nanoadditive shows hysteresis loop with significant higher saturation magnetization. Two competing interactions influence the value of saturation magnetization: dipole-dipole and exchange [51]. Presence of strong exchange interactions causes parallel arrangement of magnetic moments, which increase saturation magnetization, whereas dipole-dipole interactions induce anti-parallel arrangement of magnetic moments, thus decreasing the value of saturation magnetization. Dipole-dipole interactions are short-range and for this reasons, in the case of materials with low density of magnetic particles (as nanocomposite with 0.5% content of nanoadditive), these cannot effectively counteract the influence of exchange interactions. As a result, the value of saturation magnetization increases. The differences between experimental and calculated data may be caused by heterogeneous dispersion of magnetic nanoparticles within polymer matrix and interactions between particles from various parts of materials in measurement cell. Despite that, it can be stated that the nanocomposites with higher content of magnetic nanoadditive, possess value of saturation magnetization proportional to content of magnetic nanoparticles. Similar dependence was also observed by Kim J.-J. et al. [31].

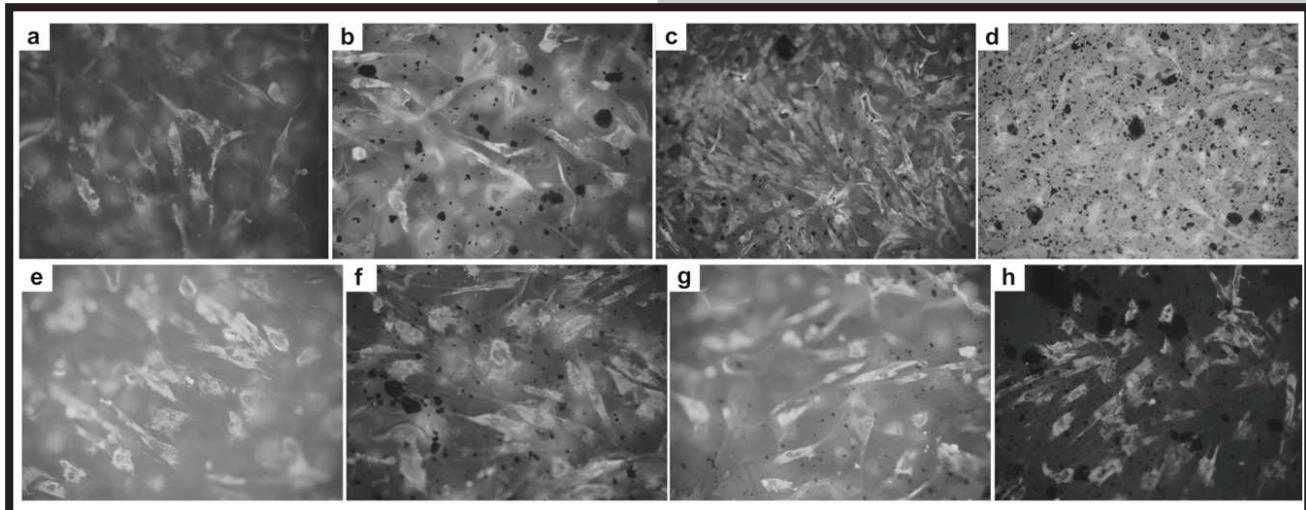
Considering the shapes of hysteresis loop (FIG. 3) obtained for nanoadditive and fabricated magnetic polymer film, it can be concluded that they have equal courses. It indicates the presence of the same type of interactions both in magnetic powder and in nanocomposite materials. It may suggest that polymer matrix is only a neutral carrier for magnetite nanoparticles and is not affecting their magnetic properties.

The incubation performed at 37°C made it possible to preliminarily determine the degradation rate of the produced nanocomposite materials in comparison to film made of poly(ε-caprolactone). A successive pH drop of the distilled water used to incubate the samples was observed with the incubation progress (TABLE 3). The pH of the water used to incubate the samples was slightly lower for the nanocomposites than for pure poly(ε-caprolactone). No significant mass loss of the examined materials was observed as a result of the incubation as the observed differences fall within the value of the measuring error (TABLE 4). The difference in the masses before and after the incubation is close to the measuring error.



RYS. 4. Wytrzymałość na rozciąganie folii z poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) oraz magnetycznych nanokompozytów przed i po inkubacji w 37°C.

FIG. 4. Tensile strength of film made of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and nanocomposites before and after incubation.



RYS. 5. Hodowle osteoblastów na folii z PCL-u (a: 3 dni, e: 7 dni) i nankompozytów o 0,5% (b: 3 dni, f: 7 dni), 1% (c: 3 dni, g: 7 dni) oraz 2% (d: 3 dni, h: 7 dni) zawartości magnetytu.

FIG. 5. Cultures of osteoblasts on foil made of PCL (a: 3 days, e: 7 days) and nanocomposites 0.5% (b: 3 day, f: 7 days), 1% (c: 3 days, g: 7 days) and 2% (d: 3 days, h: 7 days).

Wyniki badań właściwości mechanicznych przeprowadzonych dla materiałów przed degradacją wykazały niewielki spadek wytrzymałości na rozciąganie po wprowadzeniu cząstek magnetycznych do matrycy polimerowej (RYS. 4). Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że za wyjątkiem nanokompozytu zawierającego 1% nanododatku obserwowane zmiany, jakkolwiek niewielkie, są istotne statycznie. Największy spadek wytrzymałości, o 1,58 MPa, obserwowany jest w przypadku nanokompozytu polimero-wego o zawartości 2% cząstek magnetycznych. Wytrzymałości na rozciąganie dla kompozytów 0,5% oraz 1% wynoszą odpowiednio 10,28 MPa i 10,26 MPa. Należy jednak pamiętać, że ze względu na obecność licznych, dużych aglomeratów nanocząstek, wyniki badań mechanicznych nie są do końca miarodajne.

Po inkubacji materiałów przez 28 dni w temp. 37°C zaobserwowano istotny statycznie spadek wytrzymałości na rozciąganie w przypadku dwóch materiałów: folii wykonanej z czystego poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) oraz folii o najwyższej zawartości nanododatku, przy czym zmiana dla nanokompozytu polimerowego jest znaczco większa. Na podstawie badań wytrzymałościowych można przypuszczać, że biodegradacja biomateriałów będzie rozpoczynać się od miejsc, w których obecne są aglomeraty nanocząstek magnetycznych, a tym samym czas biodegradacji materiałów o wyżej zawartości nanododatku będzie krótszy w porównaniu do nanokompozytów zawierających mniejszą ilość magnetytu, a także czystego poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu). Biodegradacja matrycy polimerowej materiału zależy od rodzaju polimeru i jego budowy chemicznej, hydrofobowości, stopnia krystaliczności, długości łańcuchów polimerowych, a także porowatości, rozwinięcia powierzchni, geometrii oraz metody otrzymywania [34].

The results of the strength tests show a slight tensile strength decrease after the introduction of the magnetic particles into the polymer matrix (FIG. 4). Statistical analysis shows that, except of nanocomposite with 1% content of nanoaddition, although being small, the reported changes are significant. The biggest decrease of tensile strength, equal to 1.58 MPa, is observed for nanocomposite containing 2% of magnetic particles. Tensile strengths for nanocomposites with 0.5% and 1% content of nanomagnetite are 10.28 MPa and 10.26 Pa, respectively. It must be noted, that due to the presence of numerous, huge agglomerates, the results of mechanical tests should be treated as purely indicative.

After the incubation for 28 days in 37°C, the significant decrease in tensile strength was observed for both the pure poly( $\epsilon$ -caprolactone) film and the nanocomposite with the highest content of the nanoaddition, with more significant change in the case of the latter. Thus, it can be assumed that the degradation of fabricated materials starts from places where the agglomerates of magnetic nanoparticles are present, thus biodegradation time of nanocomposites with higher content of magnetic particles should be shorter, compared to both nanocomposite with minor amount of nanofiller and pure poly( $\epsilon$ -caprolactone). Biodegradation of material's polymer matrix depends also on a type of polymer, its chemical composition, hydrophobicity, crystallinity, length of polymer chains and porosity, surface area, geometry and fabrication method of material [34].

Zarówno czysty poli( $\epsilon$ -kaprolakton) jak i nanokompozyty okazały się nietoksyczne dla komórek (RYS. 5). Na mikrofotografiach widoczne są nie tylko dobrze rozpraszczone osteoblasty, lecz także większe aglomeraty cząstek magnetycznych w postaci czarnych obiektów zlokalizowanych poniżej komórek. Prawidłowy kształt komórek i ich równomierne rozmieszczenie na powierzchni wszystkich folii sugerują, że wytworzone materiały sprzyjają adhezji komórek, umożliwiając ich dalszą proliferację oraz różnicowanie. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że przeprowadzone badania biologiczne miały charakter badań wstępnych, a ich celem było jakościowe określenie cytotoxicznego wpływu materiałów na komórki kostne. W celu zbadania efektywności wspomagania regeneracji tkanki kostnej przez magnetyczne nanokompozyty polimerowe, planowane są dalsze badania zarówno przy absencji jak i w obecności zewnętrznego pola magnetycznego.

## Wnioski

Korzystając z prostej metody odlewania folii/odparowania rozpuszczalnika wytworzono serie magnetycznych nanokompozytów o różnej zawartości cząstek magnetycznych. Na podstawie otrzymanych wyników badań można stwierdzić, że magnetyczny nanododatek wykazuje wysoką tendencję do aglomeracji. Zarówno magnetyt jak i nanokompozyty polimerowe wykazują właściwości ferromagnetyczne. Namagnesowania nasycenia nanokompozytów polimerowych o wyższej zawartości nanododatku jest wprost proporcjonalne do ilości nanocząstek magnetycznych wprowadzonych do matrycy polimerowej. Zawartość magnetytu poniżej 2% nie wpływa znacząco na degradację materiału. Duża ilość aglomeratów nanocząstek w obrębie matrycy polimerowej stanowi defekt materiału i poprzez koncentrację naprężeń przyczynia się do obniżenia właściwości mechanicznych materiału. Wstępne badania biologiczne nie wykazały cytotoxicznego wpływu na komórki, co pozwala sądzić, że wytworzone materiały mogą znaleźć zastosowanie w terapii dostarczania leków nośnikami magnetycznymi, a także stanowić tworzywo do konstrukcji podłoży o biomimetycznych z tkanką kostną właściwościach fizycznych.

## Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach prac statutowych nr 11.11.160.616 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH Akademii Górnictwo-Hutniczej.

## Piśmiennictwo

- [1] Sanchez C., Belleville P., Popall M., Nicole L.: Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chemical Society Reviews* 40 (2011) 696-753.
- [2] Cushen M., Kerry J., Morris M., Cruz-Romero M., Cummins E.: Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology* 24 (2012) 30-46.
- [3] Bhushan B., Luo D., Schricker S.R., Sigmund W., Zauscher S., Handbook of Nanomaterials Properties. Berlin: Springer-Verlag 2014
- [4] Trahms L., Biomedical Applications of Magnetic Nanoparticles Lect. Notes Phys. 763 (2009) 327-358.
- [5] Lou L., You K., Zhang Z., Li B., Zhu J., Wang Y., Huang R., Zhu Z.: Functionalized magnetic-fluorescent hybrid nanoparticles for cell labeling. *Nanoscale* 3 (2011) 2315-2323.
- [6] Liu J., Wang L., Cao J., Huang Y., Lin Y., Wu X., Wang Z., Zhang F., Xu X., Lu G.: Functional investigations on embryonic stem cells labeled with clinically translatable iron oxide nanoparticles. *Nanoscale* 6 (2014) 9025-9033.
- [7] Cui Y-R., Hong C., Zhou Y-L., Li Y., Gao X-M., Zhang X-X.: Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell  $Fe_3O_4$ @Au magnetic nanoparticles for cell separation. *Talanta* 85 (2011) 1246-1252.

As proven by the direct contact tests, both pure poly( $\epsilon$ -caprolactone and magnetic nanocomposites are biocompatible (FIG. 5). In the microscopic photographs, well-flattened cells together with magnetic particles in the form of black objects, located below the cells, can be seen. Proper shapes and uniform distribution of cells in the whole surface of the foils suggests that fabricated materials favor the adhesion of the cells, allowing for their further proliferation and differentiation. It should be taken into account that performed biological studies are only preliminary and aimed as trial investigation of potential toxic influence of fabricated materials on osteoblast cells. In order to investigate the efficiency of magnetic composites to support bone tissue regeneration, further studies are planned, both in absence and presence of external magnetic field.

## Conclusions

With the use of the simple method of foil casting/solvent evaporation, a series of magnetic nanocomposites with different % wt. contents of magnetic particles were produced. Basing on obtained results it can be concluded that magnetic nanoaddition has high tendency to agglomerate. Both pure magnetite and magnetic nanocomposites have ferrimagnetic properties. Saturation magnetization of magnetic nanocomposites with higher content of magnetic particles is proportional to content of magnetite introduced into the polymer matrix. Content of magnetite below 2% does not influence significantly rate of degradation of the materials. However, larger amount of nanoparticles favors formation of their agglomerates, treated as a defect of materials, which may cause stress concentration, consequently decreasing mechanical properties of the material. Preliminary biological studies demonstrated biocompatibility of fabricated materials, which allows for the thesis that these materials could find their application in drug delivery systems or may be used as a promising material for constructing biomimetic bone tissue scaffold.

## Acknowledgements

This work was supported by AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Engineering – statutory works No. 11.11.160.616.

## References

- [8] He J., Huang M., Wang D., Zhang Z., Li G.: Magnetic separation techniques in a sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2014) In press
- [9] Sharifi I., Shokrollahi H., Amiri S.: Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 324 (2012) 903-915.
- [10] Laurent S., Dutz S., Häfeli U. O., Mahmoudi M.: Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advanced in Colloid and Interface Science* 166 (2011) 8-23.
- [11] Sun C., Lee J. S.H., Zhang M.: Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 1252-1265.
- [12] Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J.: Magnetic particles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research* 62 (2010) 144-149.
- [13] Mangual J.O., Avilés M.O., Ebner A.D., Ritter J.A.: In vitro study of magnetic nanoparticles as the implant for implant assisted magnetic drug targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 323 (2011) 1903-1908.

## Piśmiennictwo

- [14] Singh R.K., Patel K.D., Lee J.H., Lee E.-J., Kim J-H., Kim T-H., Kim H-W.: Potential of Magnetic Nanofiber Scaffolds with Mechanical and Biological Properties Applicable for Bone Regeneration. *PLoS ONE* 9 (4): e91584.
- [15] Panseri S., Cunha C., D'Alessandro T., Sandri M., Russo A., Giavaresi G., Marcacci M., Hung C.T., Tampieri A.: Magnetic Hydroxyapatite Bone Substitutes to Enhance Tissue Regeneration: Evaluation In Vitro Using Osteoblast-Like Cells and In Vivo in a Bone Defect. *PLoS ONE* 7 (6): e38710.
- [16] Bock N., Riminucci A., Dionigi C., Russo A., Tampieri A., Landi E., Goranov V.A., Marcacci M., Dedić V.: A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *ActaBiomaterialia* 6 (2010) 786-796.
- [17] Meng J., Xiao B., Zhang Y., Liu J., Xue H., Lei J., Kong H., Huang Y., Jin Z., Gu N., Xu H.: Super-paramagnetic responsive nanofibrous scaffolds under static magnetic field enhance osteogenesis for bone repair *in vivo*. *Scientific Reports* 3: 2655.
- [18] Daar A.S., Greenwood H.L.: A proposed definition of regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1 (2007) 179-184.
- [19] Hutmacher D.W.: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (2000) 2529-2543.
- [20] Mitra J., Tripathi G., Sharma A., Basu B.: Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response. *RSC Advances* 3 (2013) 11073-11094.
- [21] Eglin D., Mortisen D., Alini M.: Degradation of synthetic polymeric scaffolds for bone and cartilage tissue repairs. *Soft Matter* 5 (2009) 938-947.
- [22] Yu X., Xia Z., Wang L., Peng F., Jiang X., Huang J., Rowe D., Wei M.: Controlling the structural organization of regenerated bone by tailoring tissue engineering scaffold architecture. *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 9721-9730.
- [23] Bongio M., van der Beucken J.J.P., Leeuwenburgh S.C.G., Jansen J.A.: Development of bone substitute materials: from 'biocompatible' to 'instructive'. *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010) 8747-8759.
- [24] Barradas A.M.C., Yuan H., van Blitterswijk C.A., Habibovic P.: Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties experimental models and biological mechanism. *European Cells and Materials* 21 (2011) 407-429.
- [25] Albrektsson T., Johansson C.: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* 10 (2001) 96-101.
- [26] Xu H.-Y., Gu N.: Magnetic responsive scaffolds and magnetic fields in bone repair and regeneration. *Frontiers of Materials Science* 8 (2014) 20-31.
- [27] Kotani H., Kawaguchi H., Shimoaka T., Iwasaka M., Ueno S., Ozawa H., Nakamura K., Hoshi K.: Strong Static Magnetic Field Stimulates Bone Formation to a Definite Orientation In Vitro and In Vivo. *Journal of bone and mineral research* 17 (2002) 1814-1821.
- [28] Gloria A., Russo T., D'Amora U., Zeppetelli S., D'Alessandro T., Sandri M., Bañobre-López M., Piñeiro-Redondo Y., Uhlarz M., Tampieri A., Rivas J., Herrmannsdörfer T., Dedić V.A., Ambrosio L., De Santis R.: Magnetic poly(ε-caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposites substrated for advanced bone tissue engineering. *Interface* 10 (2013), 20120833.
- [29] De Santis R., Gloria A., Russo T., D'Amora U., Zeppetelli S., Dionigi C., Sytcheva A., Herrmannsdörfer T., Dedić V., Ambrosio L.: A Basic Approach Toward the Development of Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Advanced Bone Tissue Engineering. *Journal of Applied Polymer Science* 122 (2011) 3599-3605.
- [30] Kannarkat J.T., Battogtokh J., Philip J., Wilson O. C., Mehl P. M.: Embedding of magnetic nanoparticles in polycaprolactone nanofiber scaffolds to facilitate bone healing and regeneration: *Journal of Applied Physics* 107 09B307 (2010).
- [31] Kim J.-J., Singh R. K., Seo S.-J., Kim T.-H., Kim J.-H., Lee E.-J., Kim H.-W., Magnetic scaffolds of polycaprolactone with functionalized magnetite nanoparticles: physicochemical, mechanical, and biological properties effective for bone regeneration. *RSC Advances* 4 (2014) 17325-17336.
- [32] Figueirola A., Di Corato R., Manna L., Pellegrino T.: From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical application. *Pharmacological Research* 62 (2010) 126-143.
- [33] Yang J., Park S.-B., Yoon H.-G., Huh Y.-M., Hamm S.: Preparation of poly ε-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. *International Journal of Pharmaceutics* 324 (2006) 185-190.
- [34] Dash T. K., BadirennathKonkimalla V.: Poly-ε-caprolactonebased formulations for drugs delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* 158 (2012) 15-33.
- [35] Hamoudeh M., Fessi H.: Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 300 (2006) 584-590.
- [36] Świętek M., Tokarz W., Tarasiuk J., Wroński S., Błażewicz M.: Magnetic Polymer Nanocomposite for Medical Applications. *ActaPhysicaPolonica A* 125 (2014) 891-894.
- [37] Woodruff M. A., Hutmacher D. W.: The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 1217-1256.
- [38] Dash T.K., Konkimalla V. B.: Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of ControlledRelease* 158 (2012) 15-33.
- [39] Nowicka K.: Badania polimerowych kompozytów magnetycznych dla potrzeb inżynierii biomedycznej: rozprawa doktorska. Akademia Górnictwa-Hutnicza im. Stanisława Staszica, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów (2012) Kraków.
- [40] Wu W., He Q., Jiang C.: Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters* 3 (2008) 397-415.
- [41] Nowicka K., Figiel H., Błażewicz M.: Preparation and characterization of polysulfone/magnetite nanocomposites – Polychar 19: World Forum on Advanced Materials: 2011, Nepal: book of abstracts – p. 232.
- [42] Nowicka K., Figiel H., Tokarz W., Sołtysiak E., Błażewicz M.: Nanokompozyty magnetyczne dla zastosowań biomedycznych – Magneticnanocomposite for medicalapplications, Przetwórstwo Tworzyw; ISSN 1429-0472. – 1 (2013) 27-31.
- [43] Chen H.-L., Li L.-J., Ou-Yang W.-C., Hwang J. C., Wong W.-Y.: Spherulitic crystallization behaviour of poly(ε-caprolactone) with a wide range of molecular weight. *Macromolecules* 30 (1997) 1718-1722.
- [44] Tang Z. G., Black R. A., Curran J. M., Hunt J. A., Rhodes N. P., Williams D. F.: Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ε-caprolactone] films. *Biomaterials* 25 (2004) 4741-4748.
- [45] Wang G.-s., Wang L., Wei Z.-y., Sang L., Dong X.-f., Qi M., Chen G., Chang Y., Zhang W.-x.: Synthesis and characterization of poly(ε-caprolactone)/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanocomposites by *in situ* polymerization. *Chinese Journal of Polymer Science* 31 (2013) 1011-1021.
- [46] Wang G.-s., Wei Z.-y., Sang L., Chen G.-y., Zhang W.-x., Dong X.-f., Qi M.: Morphology, crystallization and mechanical properties of poly(ε-caprolactone)/graphene oxide nanocomposites. *Chinese Journal of Polymer Science* 31 (2013) 1148-1160.
- [47] Hallab N. J., Bundy K. J., O'Connor K., Moses R. L., Jacobs J. J.: Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. *Tissue Engineering* 7 (2001) 55-71.
- [48] Kubies D., Himmlová L., Riedel T., Chánová E., Balík K., Douděrová M., et al.: The Interaction of Osteoblast With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. *Physiological Research* 60 (2011) 95-111.
- [49] Noro A., Kaneko M., Murata I., Yoshinari M.: Influence of surface topography and surface physicochemistry on wettability of zirconia (tetragonal zirconia polycrystal). *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2012:00B:000-000.
- [50] Goya G. F., Berquó T. S., Fonseca F. C.: Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Physics* 94 (2003) 3520-3528.
- [51] Nishio K., Ikeda M., Gokon N., Tsubouchi S., Narimatsu H., Mochizuki Y., Sakamoto S., et al.: Preparation of size-controlled (30-100 nm) magnetite nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310 (2007) 2408-2410.
- [52] Shen L., Qiao Y., Guo Y., Men S., Yang G., Wu M., Zhao J.: Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles. *Ceramicsinternational* 40 (014) 1519-1524.
- [53] Pękała M.: Eksperymentalne metody magnetochemii. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 2013. ISBN: 978-83-235-1044-4.

## References