

# Priprema i karakterizacija elektroispređenih nosača za regeneraciju kože i oka

---

Štos, Miroslav

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:959135>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-04**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Miroslav Štos

# **DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Miroslav Štos

**Priprema i karakterizacija elektroispredanih  
nosača za regeneraciju kože i oka**

**DIPLOMSKI RAD**

Voditelj rada: **prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić**

Članovi ispitnog povjerenstva:

**prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić, FKIT**

**izv. prof. dr. sc. Nevenka Vrbos, FKIT**

**prof. dr. sc. Igor Sutlović, FKIT**

Zagreb, rujan 2019.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada.*

*Mag.ing.oecoing. Nikolini Mrkonjić hvala na pomoći i ugodnoj atmosferi prilikom izrade eksperimentalnog dijela.*

*Dr..sc. Emiliji Zdravevi na pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela.*

*Hvala mojim kolegama i kolegicama na pomoći i strpljenju, bez kojih mi ove godine studiranja ne bi prošle tako brzo i zanimljivo.*

*Najveća hvala mojoj obitelji na pruženoj podršci tijekom svih ovih godina studiranja, bez kojih sve ovo što sam postigao ne bi bilo moguće.*

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Postupak elektroispredanja proveden je na Zavodu za temeljne prirodne i tehničke znanosti, Laboratorij za elektroispredanje, na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.*

***Tema rada dio je područja istraživanja koje se provodi u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta "Ciljana izrada prototipa vlaknastog nosača za uzgoj tkivnih stanica kombiniranimelektroispredanjem–COMBOELECTROSPUN",IP-2016-06-6878, financiran od Hrvatske zaklade za znanost.***

## SAŽETAK

Elektroispredanje je postupak proizvodnje nanovlakana pomoću elektrostatskih sila. Ljudsko tkivo sklono je oštećenju. Manje rane, ogrebotine i iščašenja, pa čak i blaži lomovi kostiju lako zarastaju. Problem su potpuno oštećeni organi koji gube funkciju, kao i veliki lomovi kostiju. U rješavanju ovog problema pomaže tkivno inženjerstvo. Tkivno inženjerstvo i proizvodnja funkcionalnih tkiva i organa dio su modernih biomedicinskih istraživanja i primjena. U tkivnom inženjerstvu stanice se zasijavaju u/na biomaterijale prije transplantacije. Ti materijali zatim služe kao privremeni nosači koji unaprjeđuju reorganizaciju stanica za formiranje funkcionalnog tkiva. Nosači su napravljeni od biokompatibilnih i/ili biorazgradljivih materijala. U zadnje vrijeme koriste se biorazgradljivi vlaknasti polimeri kao matrice za uzgoj i rast različitih tkivnih stanica. Posebice, nosači dobiveni elektroispredanjem poli( $\epsilon$ -kapolaktona) (PCL-a) pokazuju dobar potencijal kao nosači tkiva za regeneraciju kože. U ovom radu postupkom elektroispredanja pripremljena su nosač od čistog PCL-a te nosači PCL-a u kombinaciji s fibroinom svile (FS) (18% PCL+50% FS), antibiotikom Cefuroximom (18 % PCL+25 % CFU) i nosači 18% PCL+50% FS uz dodatak 0,5 mas% mikro i nano TiO<sub>2</sub>. Istražen je utjecaj FS, CFU i TiO<sub>2</sub> na morfološku strukturu, viskoelastična svojstva i hidrofobnost elektroispredanih vlaknastih nosača elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM) , dinamičko mehaničkom analizom (DMA) te određivanjem kontaktnog kuta.

**Ključne riječi:** elektroispredanje; tkivno inženjerstvo; polikaprolakton; fibroin svile; titanijev dioksid

## **ABSTRACT**

Electrospinning is process of nanofiber production using electrostatic forces. Human tissue is prone to damage. Smaller wounds, scratches and sprains, and even milder fractures of the bones are easily healed. The problem are completely damaged organs that lose function as well as large-scale bone fractures. In addressing this problem, tissue engineering has a solution. Tissue engineering and manufacturing of functional tissues and organs are part of modern biomedical research and application. In tissue engineering cells are planted in biomaterials prior to transplantation. These materials then serve as temporary carriers that improve cell reorganization to form functional tissue. The carriers are made of biocompatible and or biodegradable materials. Recently, biodegradable fiber polymers are used as matrices for the cultivation and growth of different tissue cells. Specifically, scaffolds obtained by electrospinning of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) exhibit good potential as skin regeneration tissue carriers. In this work by electrospinning procedure scaffolding materials were produced: polycaprolactone (PCL) scaffold (100% PCL), combined bi-polymer scaffold silk fibroin (SF) (18% PCL+50% FS), (PCL) scaffold with antibiotic Cefuroxim (18 % PCL+25 % CFU) and 18% PCL+50% SF with incorporation of 0,5 mas.% of micro and nano TiO<sub>2</sub>. Morphology, viscoelastic properties and hydrofobicity of the scaffolds were characterized to evaluate the effect of FS,CFU and TiO<sub>2</sub> by means of scanning electron microscopy (SEM), dynamic mechanical analysis and contact angle.

**Keywords:** electrospinning; tissue engineering; polycaprolactone; silk fibroin; Titanium dioxide

# Sadržaj

<b>1.UVOD</b> .....	8
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	9
<b>2.1. Inženjerstvo tkiva</b> .....	9
2.1.1. Zahtjevi biomaterijala u inženjerstvu tkiva .....	10
<b>2.2. Biorazgradivi polimerni materijali</b> .....	12
2.2.1. Polikaprolakton kao biorazgradivi polimer .....	13
<b>2.2.2.Prirodna proteinska vlakna</b> .....	14
2.2.2.1. Svila.....	14
<b>2.5. Elektroispredanje</b> .....	18
2.5.1. Povijesni pregled .....	18
2.5.2. Princip elektroispredanja.....	18
2.5.3. Čimbenici u elektroispredanju iz polimerne otopine .....	20
2.5.4. Primjena elektroispredanih materijala.....	22
<b>2.6. Tehnike za karakterizaciju</b> .....	23
2.6.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA).....	23
2.6.2. Mjerenje kontaktnog kuta.....	25
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	26
3.1. Materijali .....	26
3.2. Priprema otopina za postupak elektroispredanja .....	26
3.3. Postupak elektroispredanja.....	27
3.4. Nanošenje TiO <sub>2</sub> .....	28
3.5. Karakterizacija elektroispredanih materijala.....	29
<b>3.5.1. Dinamičko-mehanička analiza (DMA)</b> .....	29
<b>3.5.2. Mjerenje kontaktnog kuta</b> .....	30
<b>3.5.3. Elektronski pretražni mikroskop (SEM) – izgled površine uzoraka</b> .....	30
<b>4.REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	31
4.1.Rezultati dobiveni mjerenjem kontaktnog kuta.....	31
4.2.Rezultati dobiveni dinamičko-mehaničkom analizom (DMA) .....	34
4.3. Određivanje morfologije elektroispredanih vlaknastih nosača elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM)...	

<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	41
<b>6. LITERATURA</b> .....	42
<b>7. ŽIVOTOPIS</b> .....	44



# 1.UVOD

Skлонost ljudskog organizma, tkiva i organa povredama i oštećenjima problem je s kojim se ljudi svakodnevno susreću. Taj nedostatak radi velike probleme za ljudsko zdravlje i brigu o njemu samom. Manje rane, ogrebotine i iščašenja, pa čak i blaži lomovi kostiju lako zarastaju. Liječnici u svakodnevnom radu pokušavaju naći metode liječenja kojima će što uspješnije sanirati ozljede. Neke od metoda liječenja su korištenje umjetnih organa kao što su zglobne proteze i srčani zalisci, zatim transplantacija tkiva s jednog mjesta na drugo u istom pacijentu ili transplantacija organa od jedne osobe (donora) u drugu. Svaka od tih metoda može uzrokovati i brojne probleme, od toga da organizam odbacuje transplantirani organ do nedostatka prikladnih donora. U rješavanju ovog problema pomaže tkivno inženjerstvo. Tkivno inženjerstvo temelji se na popravku i regeneraciji oštećenih tkiva i organa razvojem bioloških nadomjestaka koji vraćaju, održavaju ili poboljšavaju funkciju tkiva i organa.

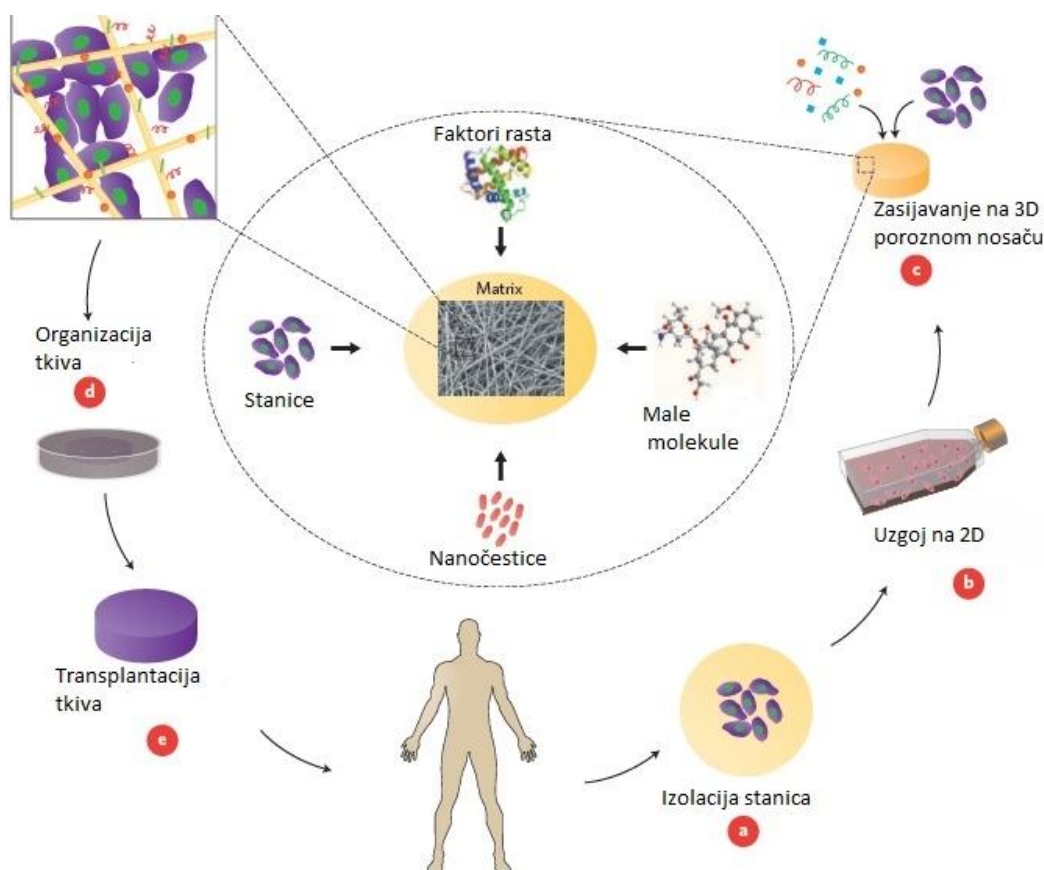
U tkivnom inženjerstvu koriste se prirodni i sintetski biomaterijali za izradu 3D nosača na koje se zasijavaju stanice izolirane iz pacijenta. Za dobivanje nosača željene topografije koristi se tehnika elektroispredanja u kombinaciji s 3D printanjem (aditivnom proizvodnjom). 3D printanje se koristi za izradu nosača određene topografije, a zatim se na njima u postupku elektroispredanja prikupljaju vrlo fina vlakna određenih svojstava. Vlakna prikupljena na kolektoru oponašaju uzorke kolektora i tako nastaju nosači koji imaju određenu mikrotopografiju pogodnu za povezivanje stanica i razvoj novog tkiva.

U ovom radu korišteni su elektroispredeni vlaknasti nosači dobiveni elektroispredanjem polikaprolaktona (PCL) jer pokazuju dobar potencijal kao nosači tkiva za regeneraciju kože i ne stvaraju štetne produkte razgradnje. Osim toga, PCL ima dobra mehanička svojstva i produljeno vrijeme razgradnje. U radu je korišten elektroispredeni nosač na osnovi polikaprolaktona (PCL) u koji je dodan fibroin svile (FS) i titanijev dioksid ( $\text{TiO}_2$ ) veličina čestica na mikro i nano razini, koji se koristi za regeneraciju kože. Fibroin svile koristi se za povećanje hidrofilitnosti i za rast stanica, a  $\text{TiO}_2$  zbog svojih antibakterijskih svojstava. Drugi elektroispredeni nosač koristi se u regeneraciji oka gdje se PCL-u dodaje antibiotik CFU. Cilj ovog rada je istražiti kako dodatak fibroina svile,  $\text{TiO}_2$  i CFU utječe na viskoelastična i morfološka svojstva te hidrofilitnost/hidrofobnost elektroispredanih nosača.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Inženjerstvo tkiva

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno znanstveno područje koje primjenjuje načela inženjerstva i prirodnih znanosti usredotočenih na rješavanje problema dugotrajnih popravaka tkiva i kako bi se zadovoljila potražnja za sigurnim, funkcionalnim i lako dostupnim zamjenama za nepovratno oštećena tkiva [1,2]. Inženjerstvo tkiva nudi nove mogućnosti u području regenerativne medicine, u kojem se omogućuje vraćanje funkcija oštećenih tkiva ili organa pacijenta. Veliki napredak u inženjerstvu tkiva postignut je upotrebom trodimenzijskih struktura (eng. *scaffold*) pripremljenih od biomaterijala u kojima se uzgajaju stanice prije transplantacije [2]. Stanice se biopsijom uzimaju iz tijela pacijenta, izoliraju i proširuju na dvodimenzijske posude za uzgoj ili se direktno nasađuju na trodimenzijski porozni biorazgradivi nosač (slika1). Nosač mora biti biokompatibilan sa nasađenim stanicama kako bi se omogućilo vezanje stanica, umnažanje, migracija i razvoj u svrhu stvaranja novog tkiva [3]. Nosači služe kao „logistički predlošci“ pružajući stanicama posebne topološke značajke, mehanički okoliš i površinske ligande, a variraju u nekoliko parametara (poroznost, elastičnost, oblik). Biorazgradivi su, a izbor polimernih biomaterijala za izradu nosača ovisi o vrsti zamjenskog tkiva koje se razvija [4]. Prvi korišteni materijali bili su dvodimenzijskog oblika, gdje se prijanjanje stanica odvijalo samo na površini nosača te su bili trajni tj. nisu se biološki razgrađivali tijekom života pacijenta. Nasuprot tome, materijali nove generacije odlikuju se trodimenzijskom poroznom strukturom, koja potiče povezanost, rast i razvoj stanica unutar materijala, uz postupnu istovremenu biološku razgradnju i regeneraciju funkcionalnog tkiva [1]. Nosač koji služi kao predložak za stvaranje tkiva najčešće je nasađen stanicama i faktorima rasta (proteinima) te podvrgnut biofizičkim podražajima u biološkim reaktorima [5]. Služi kao privremena potpora stanicama izoliranih iz prirodnog tkiva koje se potom uzgajaju i izrastaju u novo tkivo prije ugrađivanja u pacijenta [6]. Nosač se u tijelu pacijenta zamjenjuje prirodno nataloženom izvanstaničnom matricom (engl. *extracellular matrix, ECM*) koju talože stanice tijekom svog razvoja, odnosno diferencijacije. Izvanstanična matrica je prirodni biološki materijal za stvaranje tkiva te je u dinamičkoj ravnoteži s okolnom mikro-okolinom [7].



**Slika 1.** Primjer koncepta tkivnog inženjerstva koji uključuje zasiјavanje stanica unutar poroznog nosača načinjenog od biomaterijala. **(a)** Stanice su izolirane iz pacijenta i spremne za uzgoj **(b)** in vitro na dvodimenzionalnoj površini za uspješniji razvoj. **(c)** Stanice su zasiјane na poroznom nosaču zajedno sa faktorima rasta, malim molekulama i mikro/nano česticama. Nosači služe kao mehanička potpora i kalup te njihova poroznost osigurava visoki prijenos mase. **(d)** Daljnji rast stanica odvija se u bioreaktoru koji osigurava optimalne uvijete za organizaciju i funkciju tkiva. **(e)** Nakon što je funkcionalno tkivo dobiveno, konstrukcija je transplantirana na ranu kako bi se povratila funkcija [8].

### 2.1.1. Zahtjevi biomaterijala u inženjerstvu tkiva

Neovisno o vrsti tkiva, prilikom dizajniranja biomaterijala za umjetna tkiva, važno je da materijal ispunjava slijedeće uvjete: biokompatibilnost, biorazgradivost, poroznost (struktura) i čvrstoća materijala [5].

#### *2.1.1.1. Biokompatibilnost*

Prvi zahtjev koji potencijalni materijal za umjetna tkiva mora ispuniti jest biokompatibilnost. Biokompatibilnost je mjera kompatibilnosti materijala s biološkim sustavom. Stanice moraju prianjati na materijal, normalno funkcionirati, migrirati po površini i kroz nosač te se umnožavati na materijalu. Nakon ugradnje u ljudsko tijelo, nosač ne smije izazvati imunološku reakciju kako bi se spriječilo bilo kakav upalni proces koji bi mogao smanjiti ozdravljenje ili prouzročiti odbacivanje materijala od strane tijela [5].

#### *2.1.1.2. Biorazgradivost*

Jedan od ciljeva tkivnog inženjerstva je omogućiti stanicama pacijenta da zamijene ugrađeni nosač tijekom određenog perioda. Nosači nisu namijenjeni kao trajni umetci već privremeno ostaju u tijelu pacijenta. Stoga bi takav materijal trebao biti u potpunosti biorazgradiv. Nusprodukti biološke razgradnje ne smiju biti toksični i moraju izaći iz tijela bez interakcija s drugim organima. Stoga bi se takav materijal trebao razgrađivati kontroliranom brzinom razgradnje koja odgovara brzini stvaranja novog tkiva [5].

#### *2.1.1.3. Mehanička svojstva*

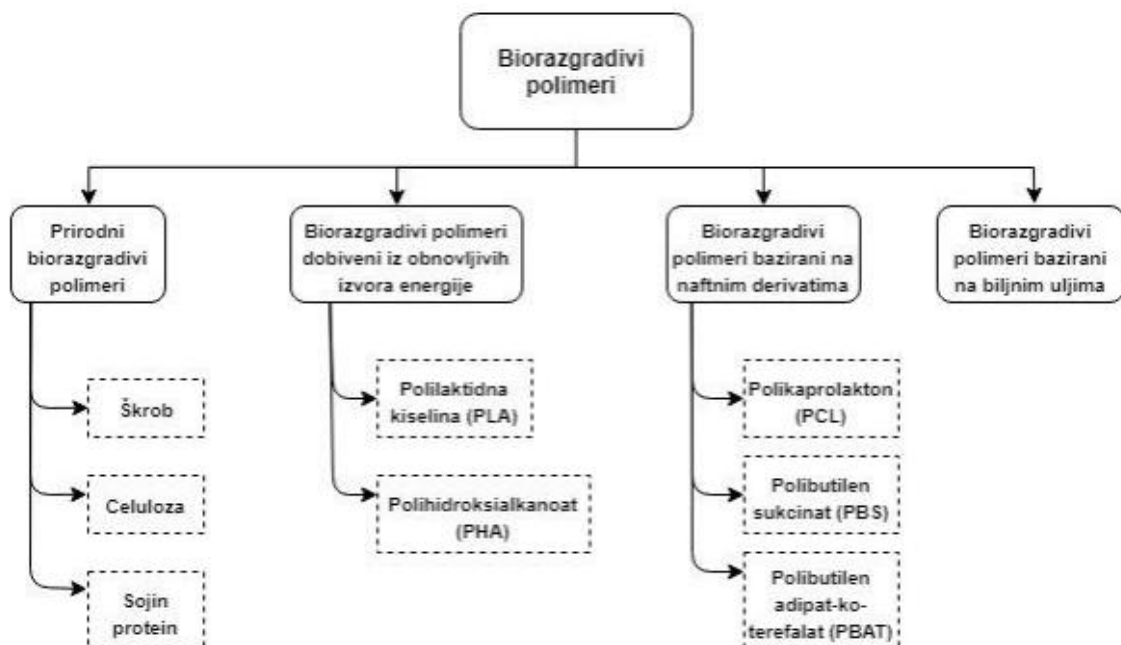
U idealnom slučaju, nosač bi trebao imati mehanička svojstva u skladu s anatomskim položajem u koji se ugrađuje te dovoljno čvrste strukture za kirurško rukovanje tijekom same ugradnje. Pored zahtjeva ugradnje, nosač bi trebao zadržavati stabilnost i tijekom biološke razgradnje. Izrada nosača s adekvatnim mehaničkim svojstvima predstavlja veliki izazov za inženjerstvo kostiju i hrskavice [5].

#### *2.1.1.4. Struktura*

Struktura nosača je iznimno važna. Nosači moraju imati visoko poroznu strukturu s dobrom međusobnom povezanošću pora radi osiguranja prohodnosti stanica, hranjivih tvari i metaboličkog otpada. Porozna struktura treba omogućiti difuziju otpadnih tvari iz nosača i migraciju stanica kroz cijeli volumen nosača. Postoje različiti kritični rasponi veličina pora ovisno o vrsti stanica i tkiva za koje se nosač proizvodi [5].

## 2.2. Biorazgradivi polimerni materijali

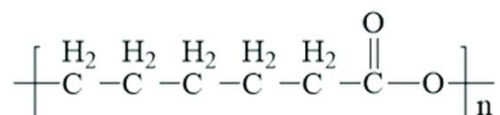
Biorazgradivi polimeri mogu se podijeliti u skladu s njihovim kemijskim sastavom, podrijetlom i načinom dobivanja, metodama prerade, ekonomskom važnosti, primjenom itd. Biorazgradivi polimeri dijele se s obzirom na podrijetlo u dvije skupine: prirodni polimeri koji se dobivaju iz prirodnih izvora i sintetski polimeri koji se dobivaju iz nafte. Pregled tih kategorija dan je na slici (slika2) [9]. Četiri glavne vrste biopolimera su škrob, šećer, celuloza te prirodni polimeri od kojih su načinjeni živi organizmi kao što su polisaharidi, hormoni, i slično. Postoje četiri osnovna načina za dobivanje biopolimera. Najpoželjniji je da se u jeftine sintetske polimere doda biorazgradiva ili fotooksidirajuća komponenta. Dakle, miješanjem plastike s punilima (škrob, glukoza) koja su podložna razgradnji pod utjecajem mikroorganizama ili uvođenjem karbonilnih skupina koje apsorbiraju UV-zrake i na taj način iniciraju razgradnju (fotolitička razgradnja plastike). Drugi, skuplji način, je da se promijeni kemijska struktura polimera dodavanjem hidrolizirajućih ili oksidirajućih skupina u ponavljajući lanac sintetskog polimera. Treći način je korištenje biopolimera ili njegovih derivata, a najpoznatiji takav materijal je bakterijski polihidroksialkanoat (PHA). Četvrti način je da se stvori nova hidrolizirajuća struktura poliestera, polianhidrida i polikarbonata [10].



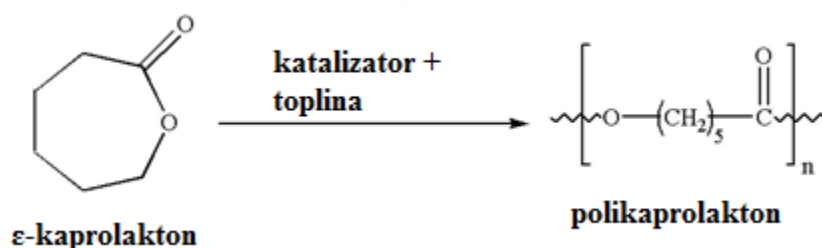
Slika 2 . Podjela biorazgradivih polimera [9].

### 2.2.1. Polikaprolakton kao biorazgradivi polimer

Polikaprolakton (PCL) je djelomično kristalni sintetski polimer (slika 3), koji je biorazgradiv i ima dobra mehanička svojstva. Dobiva se polimerizacijom otvaranjem prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona u prisutnosti kositrenog oktoata kao katalizatora. Mehanizam dobivanja (slika 4). PCL ima temperatura staklastog prijelaza oko  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a temperaturu taljenja od  $60 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri sobnoj temperaturi ima prekidnu čvrstoću od  $23\text{ MPa}$  i prekidno istezanje više od  $700\%$ . Zahvaljujući niskoj temperaturi staklastog prijelaza često se koristi kao kompatibilizator i kao meki segment u poliuretanskim materijalima. Zahvaljujući njegovoj brznoj resorpciji i dugoročnoj razgradnji u prisustvu vode (3 do 4 godine) PCL ima široku primjenu u biomedicinske svrhe. U usporedbi s ostalim alifatskim poliesterima, dobra reološka i viskoelastična svojstva čine PCL jednostavnim za proizvodnju npr. poroznih nosača, implantata, kao nosači za dostavu lijeka, šavova i zavoja, regeneraciju kardiovaskularnog i koštanog tkiva te regeneraciju živaca [11]. PCL se lako razgrađuje uz pomoć mikroorganizama [12]. Za biorazgradnju PCL-a potrebno je nekoliko mjeseci do nekoliko godina, ovisno o molekulskoj masi, stupanju kristalnosti i uvjetima razgradnje [13].



Slika 3. Strukturna formula polikaprolaktona [11]



Slika 4 . Dobivanje polikaprolaktona polimerizacijom otvaranja prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona [11].

PCL se koristi u različitim područjima primjene kao što su inženjerstvo tkiva, mikroelektronika te kao ljepila, u ambalaži itd. Njegova dobra svojstva kao što su kontrolirana razgradljivost, mješljivost s drugim polimerima i biokompatibilnost čine PCL primjenjivim u različitim područjima ukoliko postoji mogućnost kontroliranja njegovih svojstava [12].

### **2.2.2. Prirodna proteinska vlakna**

Prirodna proteinska vlakna nazivaju se i životinjskim vlaknima, jer su proteini (bjelančevine) glavna građa protoplazme žive stanice, a najviše ih ima u životinjskim organizmima i njihovim tvorbama i izlučinama kao što su životinjske dlake i svila. Bjelančevine su makromolekulski spojevi, biopolimeri, sastavljeni od aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnim vezama. Bjelančevine pokazuju neke zajedničke kemijske reakcije i podudaraju se u osnovnim oblicima strukture, ali se znatno razlikuju svojom funkcijom u organizmu. Kao izvori prirodnih proteinskih vlakana služe životinjske dlake, koje izgrađuje bjelančevina keratin i životinjska izlučina svila, koja se sastoji od bjelančevine fibroina [14].

#### **2.2.2.1. Svila**

Svilom se naziva tanko, sjajno vlakno koje proizvodi gusjenica dudova svilca. Gusjenica se izleže iz jajašca i hrani se dudovim lišćem, a nakon tri do četiri tjedna prestane se hraniti i počinje se zamatati u čahuru. Čahura nastaje pomicanjem glave i ispuštanjem dviju ljepljivih bjelančevinastih niti, koje se na zraku odmah stvrdnu u jednu. Za tvorbu čahure potroši se nit duljine tri tisuće do četiri tisuće metara, od čega se samo sedamsto do tisuću metara može odmrstiti u neprekinutu svilenu nit. Za industrijske se svrhe dudov svilac kontrolirano uzgaja u posebnim uzgajalištima. Kako bi se spriječilo da se gusjenica razvije u leptira, koji bi pri izlasku iz čahure razorio niti, čahure se prije toga izlažu djelovanju vrućeg zraka ili vodene pare i gusjenice se usmrte. Zatim se čahure namaču u vrućoj vodi, skida se vanjski sloj i nađe se početak kontinuirane niti. Više se niti ujedinijuje i provlači kroz prikladnu napravu za odmatanje s čahura te namata na vitlo kao sirova svila (tzv. grež-svila). Nit sirove svile sastoji se od dviju svilenih niti građenih od fibroina, koje su spojene ljepljivom bjelančevinom

sericinom. Sirova je svila stoga relativno debela, gruba opipa. Sericin se ostavlja na vlaknima za vrijeme pređenja i tkanja kako bi se olakšala preradba i spriječilo oštećenje finih svilenih niti. Nakon pređenja ili tkanja sericin se uklanja kuhanjem u sapunskoj vodenoj otopini. Postupak se naziva degumiranje, a dobivena degumirana svila dobiva svoj karakterističan ugodan opip, blagi sjaj i lepršavost. Pređenjem filamentnih svilenih niti i razlikama u broju pređenih niti, načinu predanja, broju uvoja i sl. postižu se učinci po kojima se svilene tkanine međusobno razlikuju. I niti s probušenih čahura iskorištavaju se i najčešće upredaju poput pamuka ili lana u nešto deblje pređe, tzv. šap, buret i floret-svila.

#### 2.2.2.1.2. Svojstva svile

Svila je vrlo tanko filamentno vlakno glatke površine, koje svilenim proizvodima daje posebno ugodan i blag sjaj. To je vrlo čvrsto vlakno, koje i u mokrom stanju zadržava do 85% svoje čvrstoće, pa se ubraja među najčvršća prirodna vlakna. Gustoća je svile relativno malena, pa su tanke tkanine suviše lagane i lepršave i treba ih otežati. Upijanje je vlage dobro i brzo.

Toplinsko izolacijska svojstva posljedica su zadržavanja zraka u prostorima među vlaknima. Zbog toga su punije svilene tkanine od pređenih pređa vrlo tople, a istodobno je svila pogodno vlakno i za ljetne vrućine, jer se od filamentne pređe izrađuju uglavnom tanke tkanine, koje na koži stvaraju osjet hladnoće. Otpornost je na prljanje dobra, jer se na površini glatkog vlakna ne zadržavaju sitne čestice prašine. Razrijeđene kiseline svilu ne oštećuju, no nešto jače kiseline uzrokuju skupljanje i ukručivanje vlakana, dok jake kiseline potpuno razgrađuju svileni fibroin.

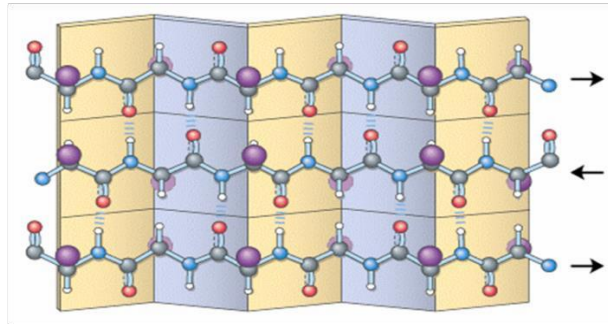
Električno izolacijska svojstva svile uzrokuju teškoće u preradbi zbog nabijanja statičkim elektricitetom, ali se mogu iskoristiti za elektroizolaciju [14].

#### 2.2.2.1.2. Struktura molekule svile

Struktura molekule svile sadrži velik udio nesupstituirane aminokiseline, glicina. Glicinski segmenti stvaraju ravne, glatke, istegnute lance koji se vrlo gusto slažu. Posljedica takvog slaganja je kristalinična struktura koja daje čvrstoću i malu fleksibilnost. Kristalični dio fibroina je heksapeptid (-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-)n. Polipeptid je složen u antiparalelne  $\beta$ -



naborane ploče, što omogućava višestruke vodikove veze okomite na peptidne lance. Općeniti prikaz antiparalelne  $\beta$ -konformacije prikazan je slikom (slika 5). Ovisno o vrsti aminokiselina, mijenja se stupanj kristalčnosti fibroina [14].

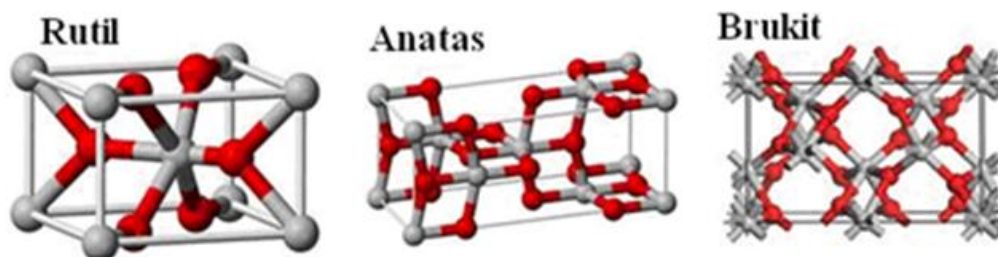


**Slika 5.** Prikaz antiparalelne  $\beta$ -konformacije.

### 2.3. Titanijev dioksid $\text{TiO}_2$

Titanij (IV) oksid je kemijski i biološki inertan, fotokatalitički stabilan materijal koji se relativno lako proizvodi i koristi.

Titanijev dioksid javlja se u tri kristalne modifikacije koje su prikazane na slici 6: mineral rutil (tetragonska struktura), mineral anatas (tetragonska struktura) i mineral brukit (romboedarska struktura).



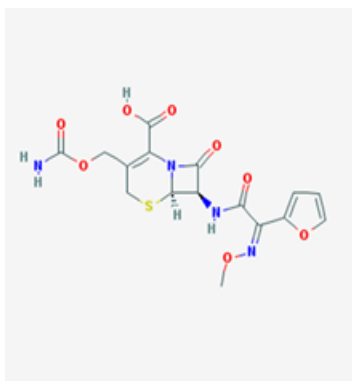
**Slika 6.** Polimorfne modifikacije  $\text{TiO}_2$

Osim kao punilo za polimerne materijale,  $\text{TiO}_2$  se koristi i u razne druge svrhe. Zbog svoje velike pokrivne moći, koristi se kao bijela boja (titanijevo bjelilo), zbog svoje netoksičnosti dio je mnogih kozmetičkih proizvoda, a koristi se također i u farmaceutskoj industriji, pa čak i

u prehrambenoj industriji kao umjetno bojilo za hranu. Važna primjena  $\text{TiO}_2$  je i u fotokatalizi. U usporedbi s drugim poluvodičima koji se također koriste u procesu fotokatalize ( $\text{ZnO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{ZnS}$ ), titanijev dioksid se smatra najdjelotvornijim fotokatalizatorom. Kao takav, koristi se u procesima počišćivanja vode i zraka, za razgradnju organskih onečišćivala te za uklanjanje mikroorganizama kao što su bakterije i virusi.

#### 2.4. Cefuroxim

Cefuroxim je antibiotik cefalosporina druge generacije, čija se struktura nalazi na slici 7.



Slika 7. Prikaz strukture Cefuroxima

Lijek Cefuroxim ima prolazne nuspojave i ljudski organizam ga dobro podnosi. Ako se konzumira nakon hrane, ovaj se antibiotik bolje apsorbira i manje je vjerojatno da će izazvati najčešće nuspojave poput dijareje, mučnine, povraćanja, glavobolje/migrene, vrtoglavice i bolova u trbuhu u usporedbi s većinom antibiotika u svojoj klasi. Ovaj antibiotik koristi se za lokalno liječenje vanjskih infekcija oka i njegovih adneksa, uzrokovanih osjetljivim bakterijama. Cefuroksim djeluje na: većinu gram-pozitivnih aerobnih bakterija *Staphylococcus aureus* te gram-negativnih bakterija poput *Escherichia coli* i *Salmonella spp*, nadalje na *S. pyogenes*, B-tip streptokoka i slično.

## **2.5. Elektroispredanje**

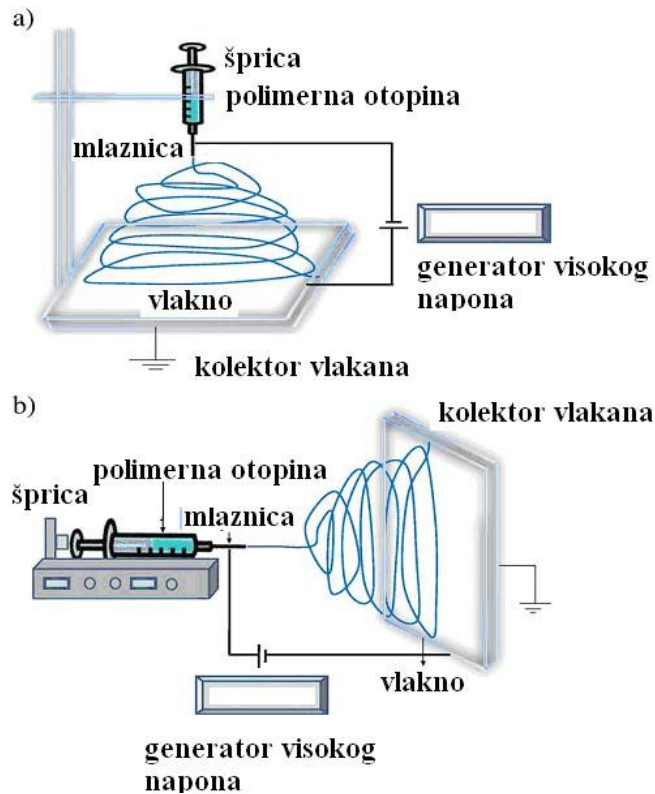
### **2.5.1. Povijesni pregled**

Osnovno načelo na kojemu se temelji elektroispredanje je gibanje fluida pod utjecajem elektriciteta poznat još iz 1600. godine kada je W. Gilbert istaknuo da će se kapljica vode na suhoj površini istežati prema gore u obliku konusa, ako bi se na određenoj udaljenosti iznad nje postavio naelektrizirani jantar. Ovaj je fenomen analizirao 1882. godine L. Rayleigh [15] i 1914. godine J. Zeleny [16]. Od 1934. pa sve do 1944. godine A. Formhals je postavio niz patenata na tom području, počevši od postrojenja za elektroispredanje celuloznih derivata pomoću nazubljenog diska, koji je predstavljao prvi pol električnog polja i gibajućeg vodljivog kolektora (npr. namotak, kolo, pokretna traka i sl.) koji je predstavljao drugi pol, a vlakna su se skupljala u paralelnom stanju. Njegovi izumi su inspiracija za mnoge današnje sofisticiranije uređaje za elektroispredanje, a koji koriste bez iglično ispredanje, ispredanje orijentiranih vlakana, i oblikovanje nanopređa.

Fizičar i matematičar G. I. Taylor postavio je 1964. i 1969. godine matematički model za konusni oblik kapljice fluida pod utjecajem električnog polja. Utvrdio je da vodljivi fluid može opstati u obliku konusa pod utjecajem električnog polja s kutom od  $49.3^\circ$ , kada su sila površinske napetosti i sila električnog polja u ravnoteži. Prema njemu je konusni oblik kapljice nazvan Taylorov konus [17]. 1981. L. Larrondo i R. St. John Manley usredotočili su istraživanja na elektroispredanje iz polimerne taline, i to talina polietilena i polipropilena [18].

### **2.5.2. Princip elektroispredanja**

Elektroispredanje je jedinstvena tehnika predanja kod koje se primjenom elektrostatskih sila proizvode fina vlakna iz polimernih otopina ili taljevina koja imaju manji promjer i veći udio površine u odnosu na volumen od onih dobivenih konvencijalnim postupcima (slika 8). Nadalje, potrebna je istosmjerna struja napona nekoliko desetaka kV. Razne tehnike kao što su elektrostatski precipitatori i sprejevi rade na sličnom principu kod kojeg električne odbojne sile nadjačaju površinsku napetost polimerne otopine/taljevine te na taj način uzrokuju izbacivanje električki nabijenog mlaza. Elektroispredanje se provodi na sobnoj temperaturi [19].



**Slika 8 .** Dva osnovna tipa uređaja za elektropredenje: a) vertikalna b) horizontalna

Uređaj za elektropredenje sastoji se od tri glavne komponente: izvora struje visokog napona, iglaste mlaznice i kolektora (obično metalna ploča ili valjak) spojenog na elektrodu suprotnog naboja koji koristi izvor visokog napona kako bi se dobio naboj određenog polariteta u polimernoj otopini ili taljevini koja se onda izbacuje prema kolektoru suprotne polarnosti. Otapanjem polimera u otapalu nastaje polimerna otopina koja se uvodi u mlaznicu za elektropredenje. Pojedini polimeri otpuštaju neugodne ili čak toksične mirise pa se proces treba voditi u prostorijama sa dobrom ventilacijom. Pri elektroispredanju na vrhu mlaznice se kapljica otopine električki nabija djelovanjem električnog polja visokog napona koji nastaje između iglaste mlaznice i suprotno nabijene elektrode te se preoblikuje u kapljicu stožastog oblika. Kada električna sila premaši kritičnu vrijednost, otopina se izbacuje s vrha stošca tvoreći mlaz. Taj mlaz u kojemu je električni naboj, postupno se isteže u dugu nit uslijed intenzivne interakcije s električnim poljem i silom odbijanja, uslijed iste vrste naboja unutar mlaza [19].

### 2.5.3. Čimbenici u elektroispredanju iz polimerne otopine

Čimbenici u postupku elektroispredanja od ključne su važnosti za izgled dobivenih vlakana. Njihovim variranjem moguće je dobiti vlakna različitog promjera i morfologije. Promjeri mogu varirati od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara, dok sama vlakna mogu biti: jednolika i glatka, porozna, spljoštena, slična vrpci, razgranata, spiralna i sl.

Tri su skupine čimbenika u elektroispredanju:

a) Čimbenici polimerne otopine:

- prosječna relativna molekulska masa polimera,
- koncentracija i viskoznost polimerne otopine,
- površinska napetost,
- elektrovodljivost otopine,
- karakteristike otapala

b) Procesni čimbenici:

- električni napon,
- brzina toka polimerne otopine,
- udaljenost između vrha mlaznice i kolektora;

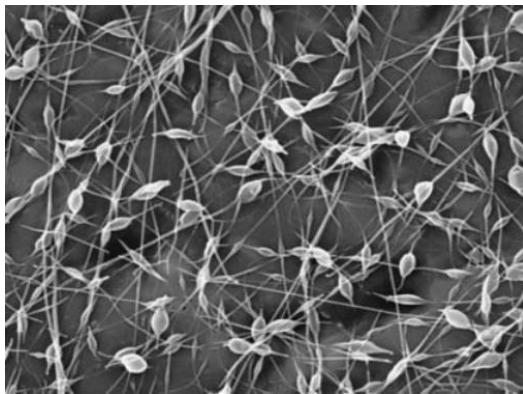
c) Čimbenici okoline:

- vlaga,
- temperatura.

Prosječna relativna molekulska masa polimera određuje koncentraciju i viskoznost polimerne otopine. Manja molekulska masa polimera zahtijeva pripremu otopine veće koncentracije i

obrnuto. Koncentracija i viskoznost polimerne otopine u direktnoj su vezi. S povećanjem koncentracije ili viskoznosti polimerne otopine raste i promjer elektroispredenih vlakana. Osim što koncentracija utječe na promjer pokazalo se da je i u direktnoj vezi s nastajanjem deformacija po duljini vlakna kao i s promjenom njihovog oblika. Tako su Fong i sur. utvrdili da se kod ispredanja vodene otopine poli-etilenoksida (PEO) veće viskoznosti povećavaju promjer vlakana, zadebljanja po duljini vlakna i udaljenost između pojedinih zadebljanja, pri čemu deformacije prelaze iz sferičnog oblika u vretenasti (slika 9) [20].

Takav učinak se tumači time da su kod niske viskoznosti otopina, vlakna mokra kada padaju na kolektor, a stvrdnjavanje je rezultat sila površinske napetosti i relaksacije, pa zbog toga dolazi do deformiranja vlakna, dok su kod velike viskoznosti otopina vlakna već suha pri dolasku na kolektor, zbog toga ostaju jednolika i nedeformirana.



**Slika 9 .** SEM mikrografija elektroispredenih poli-etilenoksidnih (PEO) nanovlakana sa zadebljanjima

Dodatkom ionske soli u polimernu otopinu povećava se njena elektrovodljivost, a rezultira elektroispredanjem tanjih i jednoličnijih vlakana. Razlog tome su ioni koji povećavaju gustoću električnih naboja mlaza, što pak povećava silu koja djeluje na istezanje mlaza. Ovisno o vrsti soli, vlakna mogu biti većeg ili manjeg promjera. Soli s manjim atomskim polumjerom imaju veću gustoću naboja pa time i veću mobilnost, što rezultira i većim istezanjem mlaza. Kao što je već navedeno, istezanje mlaza polimerne otopine počinje u trenutku kada elektrostatska sila postane veća od sile površinske napetosti. Veća površinska napetost rezultira destabilizacijom mlaza tijekom

elektroispredanja ili pojavom isprekidanog mlaza ili kapljica u slučaju niske viskoznosti otopine [21]. S dodatkom tenzida i s povećanjem njegove koncentracije smanjuje se površinska napetost i oblikuju se jednolika tanja vlakna bez deformacija.

Među procesnim čimbenicima najutjecajniji je električni napon. Općenito, veći napon uzrokuje veće istezanje mlaza, brže isparavanje otapala i smanjenje promjera vlakana zbog veće količine naboja na površini polimerne otopine. Međutim, neka istraživanja su pokazala da se s povećanjem napona povećava i protok otopine pa se time povećava i promjer vlakana [22]. Iznad određene kritične vrijednosti napona nastaju deformacije (npr. zadebljanja ili grudice) pa s povećanjem napona dolazi do povećanja broja deformacije po duljini vlakana. Druga istraživanja su pokazala suprotan efekt, zbog povećanja Coulumbove sile koja uzrokuje veće istezanje mlaza, a time i nestanak deformacija [23]. Napon se može dovesti i u vezu s kristaliničnošću elektroispredanih vlakana. U konačnici, kod optimalnog napona može se postići maksimalan stupanj kristalizacije [24].

#### **2.5.4. Primjena elektroispredanih materijala**

Elektroispredeni materijali nalaze svoju primjenu u različitim područjima zbog velikog omjera površine prema volumenu, vrlo visoke poroznosti i poboljšanih fizikalno-mehanička svojstva. Moguće je vrlo lako prilagođavati parametre procesa, te karakteristike polimerne otopine, kako bi se dobila željena morfologija vlakana i mehanička čvrstoća [25]. Od najzastupljenijih područja primjene izdvajaju se područja: filtracije, zaštitne odjeće, proizvodnje energije, specijalne membrane i biomedicine.

Područje biomedicine je jedno od najopsežnijih područja primjene elektroispredanih materijala. Tu spada i tkivno inženjerstvo gdje elektroispredanje u odnosu na druge postupke formiranja nanovlakana kao što su molekulsko samoudruživanje, fazno odvajanje i sl., pruža jednostavniji i isplativiji način proizvodnje vlaknastih nosača s međusobno povezanim strukturama pora pogodni za uzgoj tkivnih stanica pri rekonstrukciji tkiva.

Nosači koji se koriste u tkivnom inženjerstvu predstavljaju trodimenzionalne biokompatibilne strukture čija je osnovna funkcija omogućiti prijanjanje tkivnih stanica. Nosač bi trebao biti jednostavan za proizvodnju, rukovanje i pohranu. Nosači služe kao

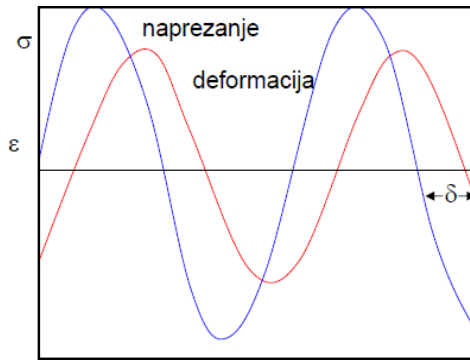
privremene podloge za rast tkivnih stanica, distribuciju, proliferaciju i diferencijaciju prije regeneracije biološki funkcionalnog tkiva. Za zacjeljivanje rana, idealni zavoj trebao bi imati određene karakteristike kao što je hemostatička sposobnost, bakterijska barijera, sposobnost apsorpcije viška izlučevina (tekućina iz rane / gnoj), odgovarajuću brzinu prijenosa vodene pare, sposobnost da se prilagodi konturi područja rane, funkcionalno prijanjanje, tj. prijanjanje na zdravo tkivo, ali ne prijanjanje na ranu, bezbolno i jednostavno uklanjanje, i na kraju niska cijena. Trenutno korištenje nanovlaknastih materijala kao medicinski zavoji još uvijek je u povojima, ali ovi materijali udovoljavaju većini zahtjeva navedenih za liječenje rana zbog svoje mikro/nano fibrilne strukture pružajući sva željena svojstva [26].

## **2.6. Tehnike za karakterizaciju**

### **2.6.1. Dinamičko mehanička analiza (DMA)**

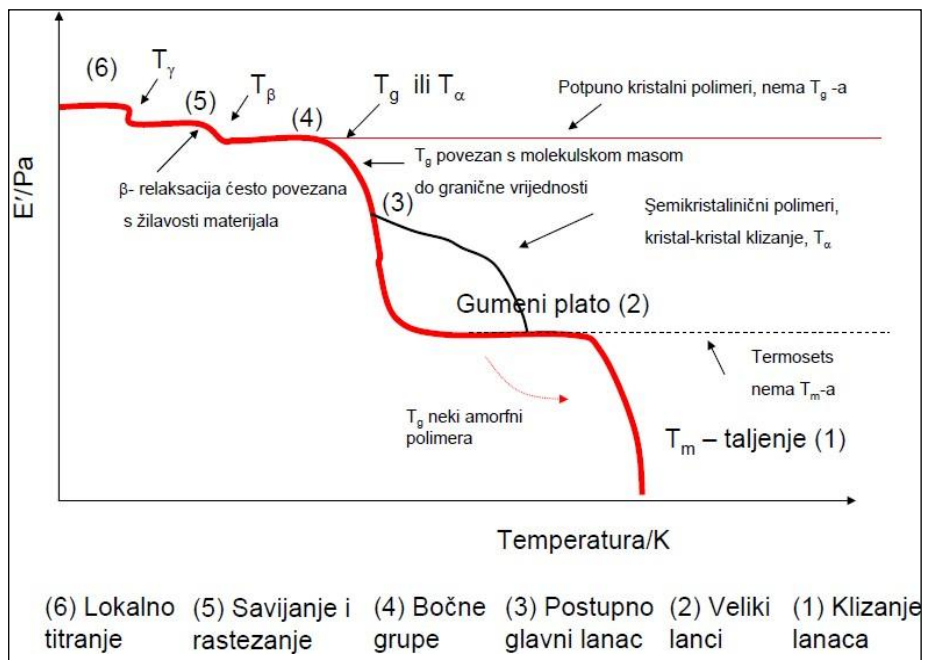
Dinamičko mehanička analiza predstavlja tehniku kojom se materijal ciklički podvrgava malim deformacijama u određenom temperaturnom intervalu. Materijal je podvrgnut naprezanju koje nije stalno nego sinusoidalno oscilira, rezultat je sinusoidalna deformacija (slika 10). Prije mjerenja namjesti se temperaturni interval u kojem se ispituje materijal, brzina zagrijavanja, frekvencija, amplituda i dimenzije uzorka. Kao rezultat mjerenja dobiva se modul gubitka ( $E''$ ), modul pohrane ( $E'$ ) i tangens kuta gubitka ( $\tan \delta$ ). Kut delta označava zaostajanje deformacije za naprezanjem. Kod idealno elastičnih krutina deformacija ( $\epsilon$ ) i naprezanje ( $\sigma$ ) su u fazi. Idealno viskozni fluidi pokazuju zaostajanje deformacije za naprezanjem za kut od  $90^\circ$ . U slučaju polimernih materijala taj je kut uvijek između  $0^\circ$  i  $90^\circ$  [27].





**Slika 10.** Odgovor polimernog materijala na naprezanje

Dinamičko mehaničkom analizom mjere se prijelazi i gibanja određenih dijelova makromolekula, kao što su klizanje pojedinih segmenata u sustavu ( $\gamma$ ), klizanje lanaca u kristalitu ( $\alpha_c$ ) ili pokretanje cijele makromolekule ( $\beta$ , staklište) (slika 11) [27].



**Slika 11.** Promjene u strukturi dobivene DMA mjerenjem

### 2.6.2. Mjerenje kontaktnog kuta

Goniometrija je znanost koja se bavi mjerenjem i određivanjem kutova i njihovih funkcija. Goniometri su uređaji koji se koriste za mjerenje kontaktnih kuteva. Kontaktni kut ( $\theta$ ) je mjera kojom se opisuje kvaliteta močenja površine i definira se kao kut koji zatvara tangenta povučena na rub kapi tekućine koja se nalazi na nekoj čvrstoj površini iz trojne točke kontakta triju faza (krute, plinovite i tekuće). Iz kontaktnog kuta moguće je odrediti površinsku napetost te slobodnu površinsku energiju [28].

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

Postupak elektroispredanja proveden je na Zavodu za temeljne prirodne i tehničke znanosti, Laboratorij za elektroispredanje, na Tekstilno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Tehnike karakterizacije koje su dio ovog diplomskog rada: dinamičko mehanička analiza (DMA) i mjerenje kontaktnog kuta metodom položene kapi (sessile drop method) pomoću uređaja za mjerenje kontaktnog kuta, goniometra, provedene su na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

Eksperimentalni dio podijeljen je u dva djela, u prvom dijelu opisan je način dobivanja elektroispredanih nosača i tehnike za njihovu karakterizaciju, nakon čega slijedi objašnjenje dobivenih rezultata mjerenja.

#### **3.1. Materijali**

U radu je korišten polimer polikaprolakton (PCL)  $M_n=80,000$ ,  $M_w/M_n < 2$  i gustoća 1.145 g/mL na 25°C (Sigma Aldrich), fibroin svile (Huzhou Xintiansi Bio-tech Co, Ltd, Kina), mikro  $TiO_2$  gustoće 3,9 g cm<sup>-3</sup> (Sigma Aldrich) i nano  $TiO_2$  (Aeroxide P25), srednji promjer čestica 21 nm gustoća 4,26 g cm<sup>-3</sup> od proizvođača Sigma Aldrich. Kao otapala koristila su se: glacijalna octena kiselina i aceton, proizvođača Sigma Aldrich.

Kolektor je izrađen postupkom 3D tiskanja od polimetilmetakrilata (PMMA). Za postizanje električne provodnosti na kolektor je nanesen grafitni sprej, Grafit, proizvođača CRC Industries Europe.

#### **3.2. Priprema otopina za postupak elektroispredanja**

Pripremljeno je ukupno pet otopina za postupak elektroispredanja, odnosno za svaki od pet uzoraka izvagana je masa od 1,8 g polikaprolaktona koja je otopljena u glacijalnoj octenoj kiselini (8 mL) i acetonu (2mL). Otopine su zatim zagrijane na temperaturi od 50 °C i

homogenizirane na magnetskoj mješalici brzinom 350 o/min. Nakon pripreme otopina u njih je dodan fibroin svile (50%) i lijek Cefuroxim (CFU) (25%) te su stavljeni na magnetsku miješalicu zbog homogenizacije.

### 3.3. Postupak elektroispredanja

Elektroispredanje pripremljenih otopina PCL-a i otopine PCL-a modificirane fibroinom svile i CFU provedeno je na uređaju za elektroispredanje, NT-ESS-300, NTSEE Co. Ltd. South Korea. Uređaj za elektroispredanje se sastoji od: šprice s iglom ravnog vrha, izvora visokog napona, pumpe i kolektora (slika 12).

Uvjeti postupka elektroispredanja su:

Električni napon (U): 17-21 V

Udaljenost igle od kolektora (x): 18 cm

Brzina protjecanja polimera (v): 1 mL/h

Šprica proizvođača, BD plastic, puni se sa po 4 mL otopine PCL-a ili otopine PCL-a modificirane fibroinom svile. Šprica s iglom stavlja se na pumpu te se postavlja uvjet brzine protjecanja otopine. Na iglu se priključi izvor napona radi raspršenja polimerne otopine. 3D izrađeni kolektori postavljaju se na 18 cm od šprice s iglom te se ispreda u vremenu od 4 sata. Nakon 4 h isključuje se izvor napona te se elektroispredeni uzorak premješta s kolektora i sprema za daljnju analizu [29].



**Slika 12.** Uređaj za elektroispredanje na Tekstilno-tehnološkom fakultetu u Zagrebu.

### 3.4. Nanošenje TiO<sub>2</sub>

U cilju postizanja antibakterijskih svojstava na dva od pet uzoraka (18% PCL i 18% PCL/50% FS) naknadno je nanesen TiO<sub>2</sub> postupkom u ultrazvučnoj kupelji. Napravljene su četiri 0,5 %-tne vodene otopine TiO<sub>2</sub> od čega su dvije nano, a dvije mikro dimenzija.

U okvire se stavljaju elektroispredeni polimerni matovi (slika 13), uranjaju se u otopine TiO<sub>2</sub> i postavljaju se u ultrazvučnu kupelj (slika 14.).

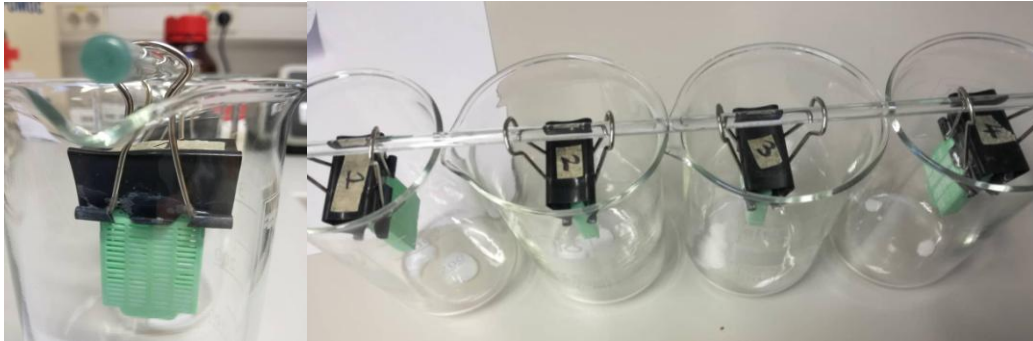


**Slika 13.** Okvir u koji se postavlja elektroispredeni vlaknasti nosači

U ultrazvučnoj kupelji okviri s uzorcima drže se 60 minuta, nakon čega su izvađeni i stavljeni na sušenje na zraku (slika 15) .



**Slika 14.** Uzorci postavljeni u ultrazvučnu kupelj



**Slika 15.** Sušenje elektroispredenih vlaknastih nosača

### **3.5. Karakterizacija elektroispredenih materijala**

#### **3.5.1. Dinamičko-mehanička analiza (DMA)**

Dinamičko mehanička analiza (DMA) provedena je na dinamičko mehaničkom analizatoru DMA 983, proizvođač TA Instruments (slika 16). Uređaj je korišten za mjerenje tangensa kuta gubitka,  $\tan\delta$ . Mjerenja su provedena na frekvenciji od 1 Hz, te uz amplitudu 0,2 mm. Brzina zagrijavanja bila je  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , a temperaturno područje od  $-100^{\circ}\text{C}$  do  $100^{\circ}\text{C}$ . Za hlađenje na niske temperature korišten je tekući dušik.



**Slika 16.** Dinamičko mehanički analizator DMA 983

### 3.5.2. Mjerenje kontaktnog kuta

Kontaktni kut određen je metodom položene kapi (*Sessile drop*) pomoću uređaja za mjerenje kontaktnog kuta, goniometra, DataPhysics OCA 20 Instruments GmbH (slika 17). Mjerni uzorci su elektroispređeni nosači PCL-a, PCL-a uz dodatak FS i uz dodatak lijeka CFU-a. Volumen kapljice vode koji je nanesen na uzorke je 2  $\mu\text{L}$ . Na svaki uzorak nanese se 3 kapljice vode te je nakon 20 sekundi mjeren kontaktni kut.



**Slika 17.** Goniometar, DataPhysics OCA 20 Instrument

### 3.5.3. Elektronski pretražni mikroskop (SEM) – izgled površine uzoraka

Za određivanje morfologije elektroispređenih uzoraka te izgleda njihove površine uzorci su snimljeni na pretražnom elektronskom mikroskopu SEM QUANTA 250, FEI, (slika 18). Prije snimanja uzorci su pripremljeni nanošenjem tankog sloja zlata kako bi postali elektrovodljivi.



**Slika 18.** SEM mikroskop QUANTA 250, FEI

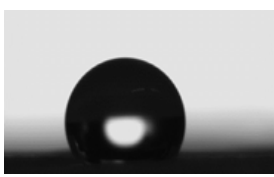
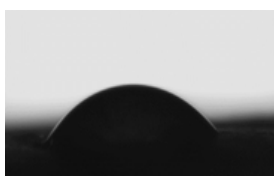

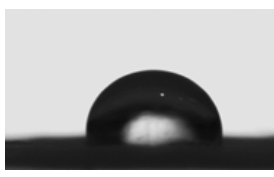

## 4.REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1.Rezultati dobiveni mjerenjem kontaktnog kuta

Mjerenje kontaktnog kuta igra važnu ulogu u karakterizaciji površine materijala. On predstavlja mjeru vlaženja krutine kapljevinom. Kapljica se razlijeva po krutoj površini do uspostavljanja ravnotežnog oblika. Sile koje djeluju na periferiji kapljice čine kontaktni kut s krutom površinom. Stanje površine određuje se obzirom na njenu polarnost, homogenost i hrapavost.

Kod elektroispređenih nosača potrebno je postići hidrofilnost radi bolje adhezije i rasta stanica, kao i ugradnje lijeka. Budući da je PCL hidrofoban materijal, za očekivati je slabiju adheziju stanica i ugradnju lijeka. Da bi se ispitala hidrofilnost, odnosno hidrofobnost provedeno je mjerenje kontaktnog kuta.

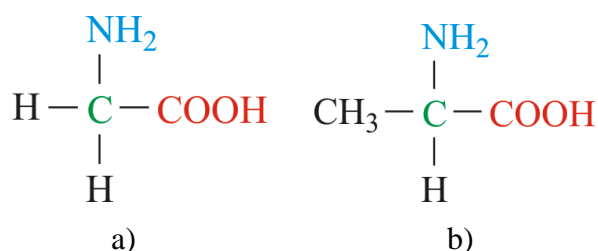
Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom za elektroispređene vlaknaste nosače prikazani su na slici 19. Poznato je da PCL vlaknasti polimerni nosači imaju kontaktni kut s vodom oko 80 °. Rezultati ovog istraživanja kontaktnog kuta nosača čistog 18 % PCL-a sa slike 19 pokazuju hidrofobnost a vrijednost iznosi  $126.5 \pm 1.4^\circ$ .

		odmah se upije
18%PCL	18%PCL/ 50% FS	18% PCL/ n-TiO <sub>2</sub>
		
18% PCL/50 % FS/n-TiO <sub>2</sub>	18% PCL /m-TiO <sub>2</sub>	18% PCL/FS/ m-TiO <sub>2</sub>

**Slika 19.** Kontaktni kut s vodom za sve elektroispređene vlaknaste nosače

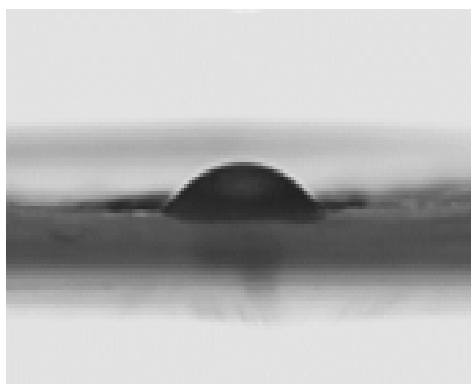


U Tablici 1. prikazane su dobivene vrijednosti kontaktnih kutova s vodom za sve ispitane elektroispredene vlaknaste nosače dobivene iz rezultata na slici 19. Iz tablice se vidi da se dodatkom fibroina svile (FS) polimernoj otopini kontaktni kut s vodom znatno smanjuje i iznosi  $42.5 \pm 3.1^\circ$  što ukazuje na hidofilnu površinu. Dobiveni rezultati kontaktnog kuta ukazuju da dodatkom FS dolazi do smanjenja hidrofobnosti elektroispredenih PCL/FS vlaknastih nosača. Ovo ponašanje može se pripisati hidrofilnim amino i karboksilnim skupinama koje se nalaze u FS, a na površini elektroispredenog vlaknastog nosača. Karboksilne skupine pridonose manjoj hidrofobnosti površine, tj. nižoj vrijednosti kontaktnog kuta. Prema literaturi fibroin svile sastoji se od hidrofobnih blokova koji se sastoje od kratkih lanaca aminokiselina kao Glicin (Gly-2-aminooctena kiselina) (slika 20a)) i Alanin (Ala-2-aminopropanska kiselina) (slika 20b)) i hidrofilnih blokova s kompleksnijim dijelovima koji sadrže velike lance aminokiselina [30].



**Slika 20.** a) Glicin (Gly-2) i b) Alanin (Ala-2) [30]

Kontaktni kut s vodom za uzorak koji sadrži CFU nije bilo moguće izmjeriti jer je CFU lijek topiv u vodi. Za taj uzorak izmjeren je kontaktni kut s glicerolom i iznosi  $30.6 \pm 0.7^\circ$  (slika 21) što ukazuje na hidofilnu površinu ovog vlaknastog nosača.



**Slika 21.** Kapljica glicerola na površini PCL-a u koji je dodan lijek CFU

**Tablica 1.** Prikaz rezultata vrijednosti kontaktnog kuta s vodom za sve elektroispredene vlaknaste nosače

UZORCI	$\theta/^\circ$
18% PCL	$126.5 \pm 1.4$
18% PCL/50 %FS	$42.5 \pm 3.1$
18% PCL/25 % CFU	-
18% PCL/nTiO <sub>2</sub>	$127.3 \pm 1.3$
18% PCL/50 % FS/nTiO <sub>2</sub>	odmah se upije
18% PCL/ mTiO <sub>2</sub>	$122.3 \pm 0.7$
18% PCL/50% FS/ mTiO <sub>2</sub>	$36.2 \pm 0$

Elektroispredeni vlaknasti nosači u koje je dodan mikro i nano TiO<sub>2</sub> (PCL/nTiO<sub>2</sub> i PCL/mTiO<sub>2</sub> vlaknasti nosači) kao antibakterijski agens, a s ciljem primjene materijala za zasijavanje fibroblastnih stanica imaju kontaktni kut s vodom  $127.3 \pm 1.3^\circ$  (nTiO<sub>2</sub>) odnosno  $122.3 \pm 0.7^\circ$  (mTiO<sub>2</sub>). Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da su površine tih uzoraka hidrofobne, odnosno da dodatak TiO<sub>2</sub>, bio on nano ili mikro dimenzija ne utječe na smanjenje hidrofobnosti površine. Visoke vrijednosti kontaktnih kuteva s vodom mogu biti posljedica male količine TiO<sub>2</sub> na nosaču, njegove loše raspodjele ili aglomeracije čestica TiO<sub>2</sub> uslijed većih interakcija između čestica punila nego čestica punila i polimera. Rješenje za to je povećati vrijeme nanošenja TiO<sub>2</sub> u ultrazvučnoj kupelji, modifikacija površine PCL elektroispredene nosača s NaOH ili direktno dodati TiO<sub>2</sub> u otopinu za elektroispredanje.

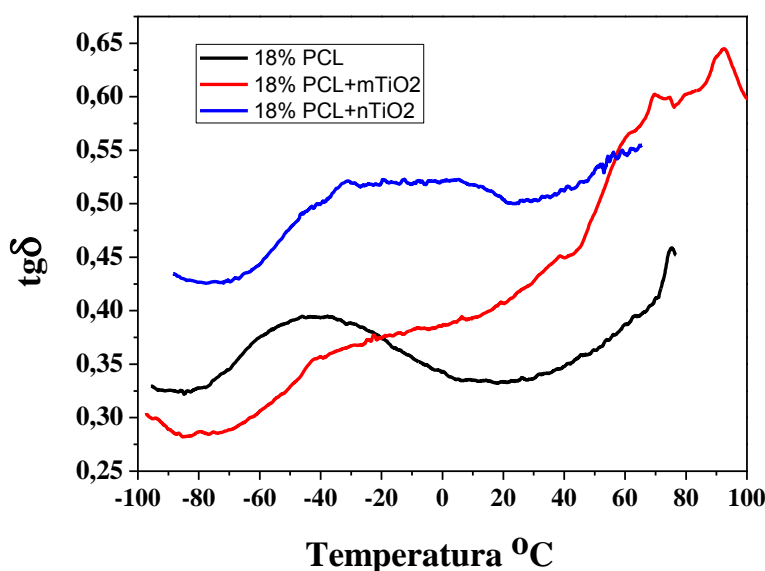
Kod elektroispredjenih vlaknastih nosača koji sadrže i fibroin svile i  $\text{TiO}_2$  kontaktni kut je znatno manji kod vlaknastog nosača u koji je dodan  $m\text{TiO}_2$  ( $36.2 \pm 0^\circ$ ) u odnosu na čisti PCL nosač i PCL/FS nosač odnosno te površine su hidrofilne. Sliku kapljice za vlaknasti nosač u koji je dodan FS i  $n\text{TiO}_2$  nije bilo moguće dobiti jer je zbog izrazite hidrofilnosti nosač odmah upio kapljicu vode. U oba navedena vlaknasta nosača dolazi do nastajanja hidrofilne površine. Smanjenje hidrofobnosti može se pripisati hidrofilnim amino i karboksilnim skupinama koje se nalaze u fibroinu svile.

## 4.2. Rezultati dobiveni dinamičko-mehaničkom analizom (DMA)

Primjenom tehnike dinamičko mehaničke analize (DMA) određuju se viskoelastična svojstva materijala. Komponenta naprezanja koja je u fazi s deformacijom naziva se modul pohrane ( $E'$ ), a povezana je sa svojstvom elastične komponente u polimernom viskoelastičnom materijalu, dok se komponenta naprezanja vezana za viskoznu komponentu naziva modulom gubitka ( $E''$ ). Modul gubitka je proporcionalan izgubljenoj mehaničkoj energiji, odnosno energiji koja se pri deformaciji zbog unutrašnjeg trenja u materijalu pretvara u toplinu. Dobiveni relaksacijski maksimumi daju uvid u strukturu materijala.

U radu je DMA tehnikom određen tangensa kuta gubitka ( $\text{tg}\delta$ ) o temperaturi ( $\text{tg}\delta/T$ ) za čisti PCL vlaknasti nosač i PCL nosače s FS, CFU i mikro i nano  $\text{TiO}_2$  kako bi se ispitao utjecaj navedenih dodataka na promjene u temperaturi staklastog prijelaza ( $T_g$ ). Vrijednosti očitane iz krivulja prikazane su u tablici 2.

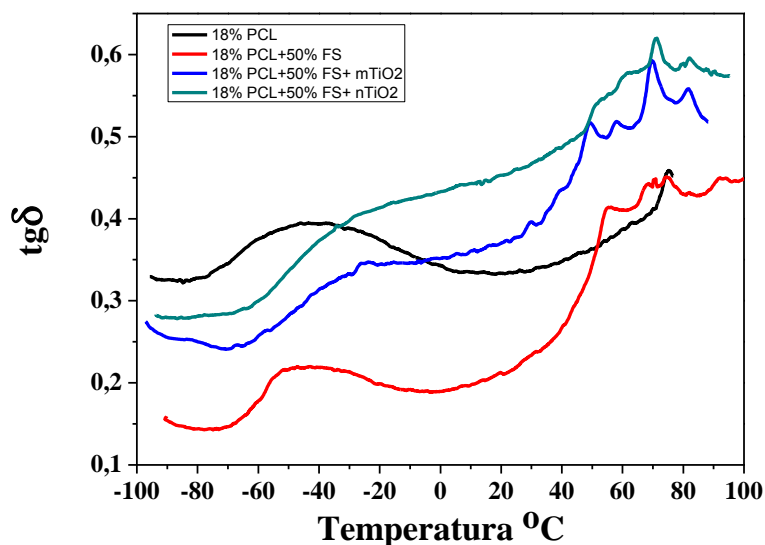
Relaksacijski spektri ovisnosti tangensa kuta gubitka o temperaturi ( $\text{tg}\delta/T$ ) za elektroispredjene vlaknaste nosače 18%PCL, 18%PCL/ $m\text{TiO}_2$  i 18%PCL/ $n\text{TiO}_2$  prikazani su na slici 22. Na svim krivuljama  $\text{tg}\delta/T$  javljaju se relaksacijski maksimumi na temperaturi ispod sobne temperature koji odgovaraju temperaturi staklastog prijelaza ( $T_g$ ) amorfne faze PCL-a.



**Slika 22.** Krivulje tgδ u ovisnosti o temperaturi za 18%PCL, 18%PCL/mTiO<sub>2</sub> i 18%PCL/nTiO<sub>2</sub>

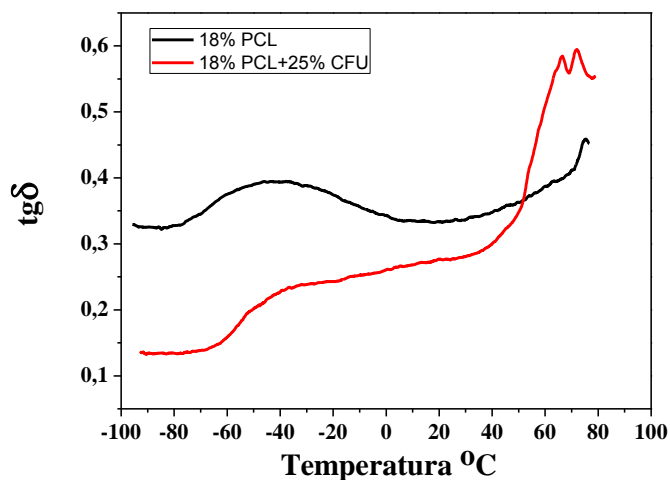
Dodatkom mikro TiO<sub>2</sub> dolazi do neznatnog pomaka staklišta na više temperature (-42,2 °C) u odnosu na čisti PCL vlaknasti nosač (-45,9 °C) za razliku od nano TiO<sub>2</sub> kod kojeg je pomak T<sub>g</sub>-a na znatno više temperature (-31,2 °C) što ukazuje na smještanje čestica TiO<sub>2</sub> u amorfnu fazu PCL-a i smanjenje njezine pokretljivosti.

Iz krivulja tgδ u ovisnosti o temperaturi za 18%PCL, 18%PCL/50% FS, 18% PCL/50% FS/mTiO<sub>2</sub> i 18% PCL/50% FS/nTiO<sub>2</sub>, elektroispredjenih vlaknastih nosača prikazanih na slici 23 vidljivo je proširenje relaksacijskog maksimuma dodatkom proteina FS te mTiO<sub>2</sub> i nTiO<sub>2</sub> u odnosu na čisti PCL i PCL/FS vlaknasti nosač bez dodatka TiO<sub>2</sub>. Temperatura staklastog prijelaza uz dodatak mTiO<sub>2</sub> pomaknuta je s -47,2 °C na -26,0 °C dok je kod nTiO<sub>2</sub> taj pomak s -42,2 °C na -34,2 °C. Može se zaključiti da se amorfna faza FS (koji u svojoj strukturi ima amorfnu i kristalnu fazu), dijelom smješta u amorfnu fazu PCL-a i dolazi do pokretljivosti PCL-a i pomaka T<sub>g</sub> na nižu temperaturu. Dodatkom TiO<sub>2</sub> pokretljivost se smanjuje i T<sub>g</sub> raste dodatkom m i n TiO<sub>2</sub>.



**Slika 23.** Krivulja  $\text{tg}\delta$  u ovisnosti o temperaturi za 18%PCL, 18%PCL/50% FS,18% PCL/50% FS/mTiO<sub>2</sub> i 18% PCL/50% FS/nTiO<sub>2</sub>

Elektroispređeni vlaknasti nosač koji u svojoj strukturi sadrži antibiotik CFU ima viši  $T_g$ , što je vidljivo na slici 24 i iz tablice 2 čemu pridonosi kristalna struktura CFU koja smanjuje pokretljivost amorfne faze PCL-a.



**Slika 24.** Krivulja  $\text{tg}\delta$  u ovisnosti o temperaturi za 18%PCL i 18%PCL/25% CFU

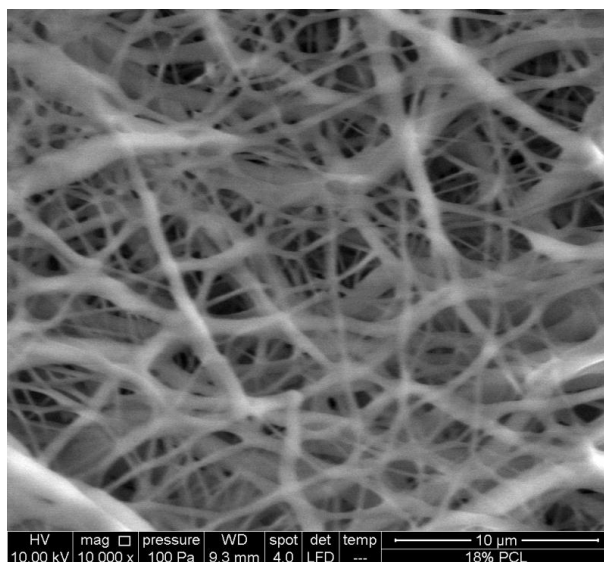
**Tablica 2.** Prikaz rezultata dobivenih dinamičko mehaničkom analizom

UZORAK	$T_{g(tg\delta)}/^{\circ}C$
18% PCL	-45,9
18% PCL/FS	-47,2
18% PCL/CFU	-42,2
18% PCL/nTiO <sub>2</sub>	-31,2
18% PCL/FS/ nTiO <sub>2</sub>	-34,2
18% PCL/mTiO <sub>2</sub>	-42,2
18% PCL/FS/mTiO <sub>2</sub>	-26,0

#### **4.3. Određivanje morfologije elektroispredenih vlaknastih nosača elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM)**

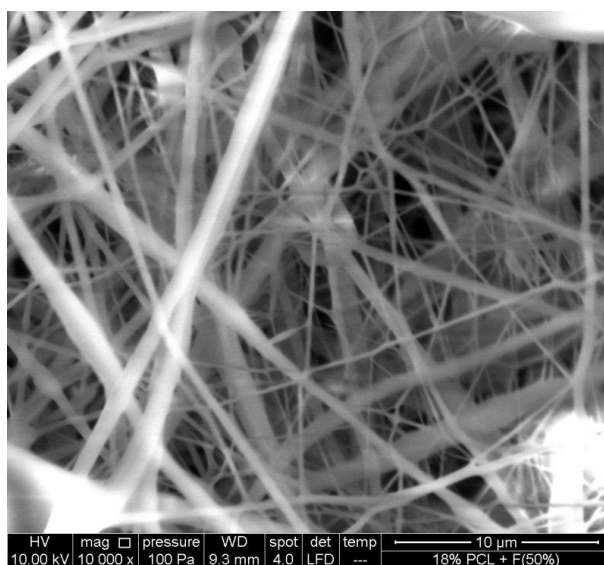
Općenito na morfološku strukturu i promjer vlakana elektroispredenih vlaknastih nosača utječu svojstva otopine (viskoznost, električna provodnost, napetost površine) te parametri procesa elektroispredanja (napon, protok otopine, promjer igle i udaljenost između igle i kolektora).

Na slici 25 prikazane su SEM mikrografije elektroispredenog PCL vlaknastog nosača uz povećanje 10 000 x .Vidljiva je raspodjela nasumično orijentiranih isprepletenih vlakana kružnog poprečnog presjeka većeg i manjeg promjera. Površina vlakana je pravilna, nema defekata i velike je poroznosti.



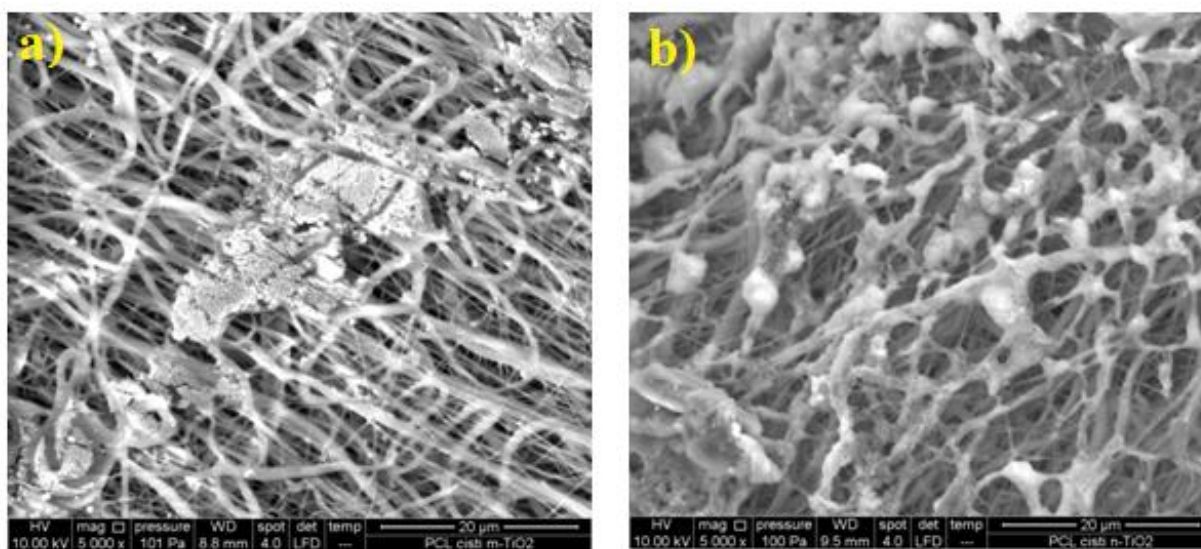
**Slika 25.** SEM mikrografije elektroispredenog 18 % PCL vlaknastog nosača uz povećanje od 10 000x

SEM mikrografija elektroisredenog 18%PCL/50% FS vlaknastog nosača prikazana je na slici 26. Dodatkom fibroina svile dobivena su vlakna manjeg promjera, bez vidljivih defekata u strukturi.



**Slika 26.** SEM mikrografije elektroispredenog PCL/FS vlaknastog nosača uz povećanje od 10 000x

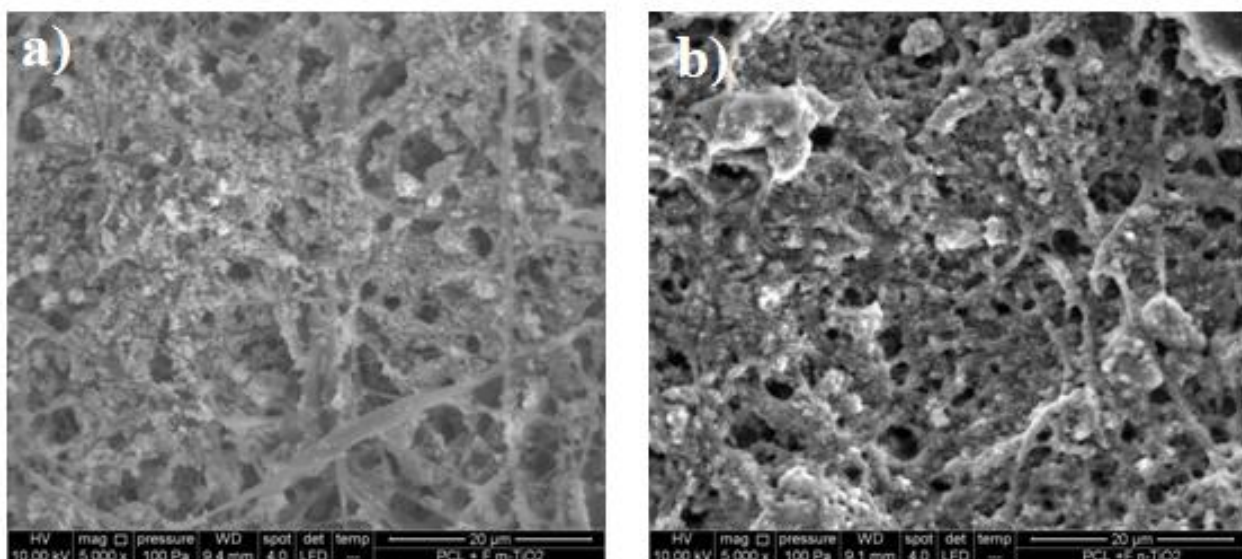
Kako bi se postiglo antibakterijsko djelovanje vlaknastih nosača kao antibakterijski agens dodan je  $\text{TiO}_2$  mikro i nanometarskih veličina čestica [31]. Iz SEM mikrografija za elektroispredene 18%PCL/m $\text{TiO}_2$  i 18%PCL/n $\text{TiO}_2$  vlaknaste nosače prikazane na slici 27 a) i 27 b) vidljivo je da nakon 60 minuta držanja vlaknastih nosača u  $\text{TiO}_2$  suspenziji na ultrazvučnoj kupelji dolazi do deponiranja  $\text{TiO}_2$  na površini nosača. Čestice punila nisu ravnomjerno raspoređene, nego imaju tendenciju aglomeracije, također je vidljivo da se deponirala veća količina n $\text{TiO}_2$ .



**Slika 27.** SEM mikrografije elektroispredenog 18%PCL/m $\text{TiO}_2$  a) i 18%PCL/n $\text{TiO}_2$  b) vlaknastog nosača uz povećanje od 5000x

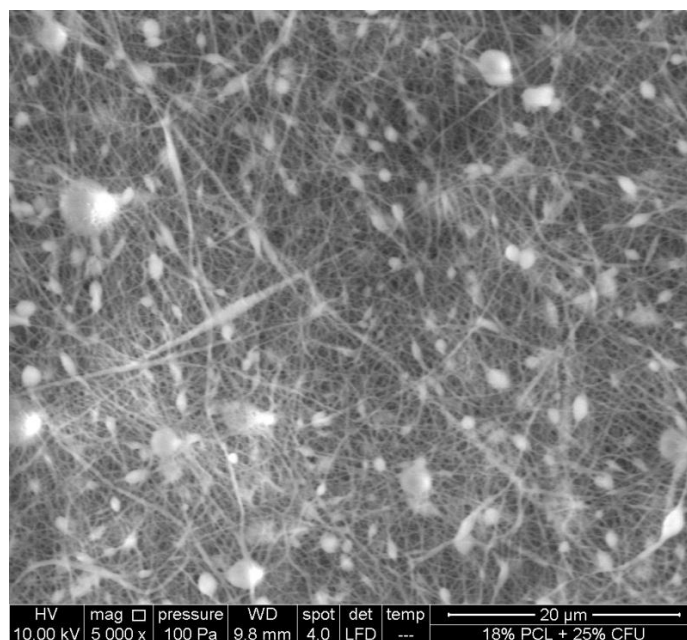
Na SEM mikrografijama PCL/FS vlaknastog nosača u koji su dodane čestice m $\text{TiO}_2$  i n $\text{TiO}_2$  (slika 28 a) i 28 b)) jasno je vidljivo da se je deponirala veća količina čestice m $\text{TiO}_2$  i n $\text{TiO}_2$ , čestice su gušće raspoređene na površini i unutar vlakana posebno kod nosača s n $\text{TiO}_2$ .





**Slika 28.** SEM mikrografije elektrospredenih a) 18% PCL/50%FS/mTiO<sub>2</sub> i b) 18% PCL/50%/nTiO<sub>2</sub> vlaknastih nosača

U slučaju elektrospredenog vlaknastog nosača s antibiotikom CFU (18%PCL/25% CFU nosač) (slika 29) dobivena je dosta ravnomjerna struktura vlakana malog promjera (vlakna su tanja) ali uz pojavu nasumično raspoređenih zrna (defekata) u vlaknastoj strukturi.



**Slika 29.** SEM mikrografija elektrospredenog 18%PCL/25% CFU vlaknastog nosača

## 5.ZAKLJUČAK

Postupkom elektroispredanja pripremljeni su vlaknasti nosači različitog sastava koji su potencijalni kandidati u regeneraciju kože i oka.

Promjenom odgovarajućih procesnih parametara kod elektroispredanja dobivena je zadovoljavajuća geometrija nosača za postizanje njihovih željenih svojstava (za zasijavanje, adheziju i rast stanica).

TiO<sub>2</sub> se koristi zbog antibakterijskih svojstava, a FS zbog smanjenja hidrofobnosti nosača i rasta stanica.

Dinamičko mehanička analiza pokazala je kako dodatkom TiO<sub>2</sub> u PCL raste T<sub>g</sub> nosača, također T<sub>g</sub> je na višoj temperaturi kod PCL/FS/TiO<sub>2</sub> vlaknastih nosača.

Kod PCL elektroispredenog nosača koji sadrži FS dolazi do smanjenja kontaktnog kuta s vodom što ukazuje na povećanje hidrofилnosti i obećavajući PCL nosač kod kojeg se očekuje dobro zasijavanje i rast stanica kože.

SEM mikrografije pokazuju vlaknastu poroznu strukturu nosača dobivenih elektroispredanjem i vidi se da je TiO<sub>2</sub> ugrađen u strukturu PCL vlaknastog nosača.

Na SEM mikrografijama vidljiva je veća količina nTiO<sub>2</sub> deponirana na PCL/FS vlaknastom nosaču.

## 6. LITERATURA

1. Bačáková, L.; Filová, E.; Rypáček, F.; Švorčík, V.; Starý, V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering, *Physiological Research* 53 (2004) 35 – 45.
2. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., Chiellini, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 403 – 440.
3. Moroni, L.; Elisseeff, J.H. Biomaterials engineered for integration, *Materials Today* 5 (2008) 44 – 51.
4. Jakab K, Norotte C, Marga F, Murphy K, Vunjak-Novakovic G, Forgacs G, Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* (2010) 2(2):022001.
5. O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today* 14 (2011) 88 – 90.
6. Recum, A.F. Handbook of biomaterials evaluation: Scientific, technical and clinical testing of implant materials, Taylor&Francis, London (1987) 115.
7. Badylak, S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material, *Biomaterials* 28 (2007) 3587 – 3593.
8. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* 260 (1993) 920–926
9. Ghanbarzadeh B. i Almasi H., Biodegradable Polymers "Biodegradation - Life of Science", ed. Chamy R., Rosenkranz F., Published: June 14 (2013)
10. Albertsson, A.C., Karlsson, S., *Macromol. J., Sci. Pure. Appl. Chem.*, 33 (1996) 1565–1570.
11. Debasish Mondal, May Griffith & Subbu S. Venkatraman Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges (2016) 255-256.
12. Vroman, I., Tighzert, L., Biodegradable polymers, *Materials*, 2 (2009) 309 – 310.
13. Labet, M., Thielemans, W., Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.*, 38 (12) (2009) 3484.-3485.
14. R. Čunko, V. Friščić, *Tekstilna vlakna*, Naklada Modus, Zagreb, (2001) 50-55.
15. Rayleigh L.: On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity, *Philosophical Magazine* 14 (1882.), 184-186)
16. Zeleny J.: The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces, *Physical Review* 3 (1914.) 2, 69.
17. Taylor G.: Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences: The Royal Society; 1969. 453-475).*

18. Larrondo L. et al.: Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* 19 (1981.) 6, 909-920).
19. Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C* 2007;27:504–509.
20. Fong H. et al.: Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer* 40 (1999.) 16, 4585-4592).
21. Hohman M.M. et al.: Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory, *Physics of Fluids* (1994-present) 13 (2001.) 8, 2201- 2220)
22. Demir M.M. et al.: Electrospinning of polyurethane fibers, *Polymer* 43 (2002.) 11, 3303-3309)
23. Jarusuwannapoom T. et al.: Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers, *European Polymer Journal* 41 (2005.) 3, 409-421)
24. P. D. Dalton, C. Vaquette, B. L. Farrugia, T. R. Dargaville, T. D. Brown, D. W. Hutmacher, *Electrospinning and additive manufacturing: Converging technologies. Biomater. Sci.*, 2013, 1, 171–185.
25. Thandavamoorthy, S. i sur., Electrospinning of Nanofibers, *Journal of applied polymer science*, (2004)
26. Bhardwaj, N. i sur., Electrospinning a fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 2009.
27. Govorčin Bajsić, E. *Polimerne mješavine*. Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb (2012).
28. Krasowska M., Zawala J., Malysa K., Air at hydrophobic surfaces and kinetics of three phase contact formation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 147–148 (2009) 155–169
29. E. Zdraveva i sur., *Elektroispredanje – značajna tehnika 21. stoljeća, Tekstil*, Zagreb, 2016, 65(11-12) 397-409
30. Zhang, Kuihua, et al., Fabrication of silk fibroin blended P (LLA- CL) nanofibrous scaffolds for tissue engineering, *J. Biom. Mater. Res. Part A*, **93** (3) (2010) 984-993.
31. J S. Zaiss, T. D. Brown, J. D. Reichert, A. Berner, Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Scaffolds Fabricated by Melt electrospinning for Bone Tissue Engineering, *Materials*, 2016, **9**, 232.

## 7. ŽIVOTOPIS

Miroslav Štos [REDACTED] U Svetoj Nedelji pohađao je Osnovnu školu >Sveta Nedjelja< nakon koje upisuje Opću gimnaziju >Antun Gustav Matoš< u Samoboru.

Akadske godine 2013./2014. redovno upisuje preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

Na trećoj godini preddiplomskog studija odrađuje studentsku praksu u tvrtki Genera d.d. u Svetoj Nedelji. Preddiplomski studij završava 21. 9. 2017. obranom završnog rada na temu Elektrodijaliza-pregled stanja pod vodstvom mentora, prof. dr. sc. Krešimira Košutića. Te iste godine upisuje diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na istoimenom fakultetu.