



Splošna gimnazija

Kontrolirano sproščanje aktivnih zdravilnih učinkovin iz poroznih biomaterialov

RAZISKOVALNA NALOGA

Avtorja:

Matjaž Korenak, 4.C

Ana Lee Pantner, 4.C

Mentorja:

Jožica kovač prof.

dr. Gregor Kravanja

Celje, 2020

Kontrolirano sproščanje aktivnih zdravilnih učinkovin iz poroznih biomaterialov

RAZISKOVALNA NALOGA

Avtorja:

Matjaž Korenak, 4.C

Ana Lee Pantner, 4.C

Mentorja:

Jožica kovač prof.

dr. Gregor Kravanja

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2020

Zahvala

Zahvaljujeva se za strokovno pomoč in vodenje dr. Gregorju Kravanji in prof. Jožici Kovač.

Povzetek

V raziskovalni nalogi je predstavljena okolju prijazna sinteza novih poroznih tridimenzionalnih biomaterialov v katere smo ujeli zdravilno aktivno učinkovino ob uporabi metode penjenja s superkritičnim CO₂. V prvem koraku smo biorazgradljiv praškast material raztopili v topilu etil laktat in raztopini dodali določen delež antiinflektorne učinkovine ciprofoksacina. Nato smo s pomočjo supekritičnega CO₂ izvedli ekstrakcijo topila etil laktata iz ratopine kar je privedlo do nastanka visoko poroznega biomaterila. Dobljene porozne vzorce smo podrobno okarakterizirali. Morfologijo in poroznost določili z uporabno mikroskopa ESEM, z IR spektroskopijo smo analizirali kompozitno sestavo, z meritvami kontaktnih kotov pa izmerili vpojnost tekočine. Sproščanje aktivne učinkovine smo ovrednotili s pomočjo UV-VIS sprektoskopije.

Uspešno smo sintetizirali nove porozne biokompozite in vanje ujeli aktivno učinkovino, ki se je iz poroznih matrik sproščala kontrolirano. Dobljeni porozni biokompoziti predstavljajo pomemben doprinos na področju tkivnega inženiringa, kjer ostajajo številni izzivi povezani z lokalno dostavo zdravila na mestu infekcije.

Ključne besede: biomateriali, polikaprolakton, mikro celuloza, FTIR, ESEM, kontaktni koti, biomedicina

VSEBINA

1	UVOD	7
1.1	Namen in cilji seminarske naloge.....	7
1.2	Hipoteze	7
2	ZNANSTVENO OZADJE	8
2.1	Biomateriali in umetni materiali.....	8
2.2	Polikaprolakton (PCL)	9
2.3	Celulozni nanodelci	10
2.4	Hidroksiapatit (HAP)	11
2.5	Ciprofloxacín	12
2.6	Superkritični CO ₂	13
3	METODOLOGIJA DELA.....	16
3.1	Material	16
3.2	Priprava poroznega ogrodja s scCO ₂	16
3.3	Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop	17
3.4	Poroznost materialov	18
3.5	Kontaktne koti	19
3.6	FTIR analiza	19
3.7	Sproščanje aktivne učinkovine iz biomateriala	20
4	REZULTATI IN DISKUSIJA	22
4.1	Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop	22
4.2	Poroznost	24
4.3	FTIR analiza	26
4.4	Kontaktne koti	27
	Testi sproščanja aktivne učinkovin	29
4.5		29
5	ZAKLJUČEK	31
6	VIRI IN LITERATURA	33
7	VIRI SLIK	35

SLIKE

Slika 1: Strukturna formula Polikaprolaktona (PCL)	
Slika 2: Strukturna formula Nanoceluloze	10
Slika 3: Strukturna formula Hidroxiapatita	
Slika 4: Strukturna formula Ciprofloxacina	
Slika 5: Fazni diagram	14
Slika 6: Visokotlačni reaktor	17
Slika 7: Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop	18
Slika 8: Aparatura za merjenje kontaktnih kotov	
Slika 9: Epruvete za opravljanje testa sproščanja	20
Slika 10: Analiza sproščanja	21
Slika 11: PCL	22
Slika 12: PCL+10%celuloza+10%Hap	22
Slika 13: PCL+ 30% celuloza	23
Slika 13: PCL+10% celuloza	23
Slika 14: FTIR analiza PCL+10%celuloze+10%Hap+ciprofloxacina	26
Slika 17: Analiza kontaktnega kota; PCL	27
Slika 18: Graf sproščanja 1% koncentracije zdravilne učinkovine iz kompozitov	29
Slika 19: Graf sproščanja 5% koncentracije zdravilne učinkovine iz kompozitov	

PREGLEDNICE

Tabela 1: Masa valjaste posode in etanol	24
Tabela 2: masa valjaste posode + etanol + masa biorazgradljivega kompozita	24
Tabela 3: masa valjaste posode + etanol po odvzemu poroznega biorazgradljivega materiala	24
Tabela 4: masa poroznega biomateriala	25

1 UVOD

Sva dijaka Gimnazije Celje-Center in izdelala sva raziskovalno nalogo z naslovom Kontrolirano sproščanje aktivnih zdravilnih učinkovin iz poroznih biomaterialov.

1.1 Namen in cilji seminarske naloge

Za razvoj poroznih tridimenzionalnih biomaterialov z ujeta aktivno učinkovino smo uporabili nekonvencionalni visokotlačni postopk s superkrični CO₂. Biorazgradljiv praškast material, za sintezo smo zmešali z raztopino protimikrobne aktivne učinkovine ciprofloksacina. Nato smo izvedli penjenje s pomočjo postopka s superkričnim CO₂, postopku za doseg poroznih kompozitnih materialov z različno koncentracijo ujete aktivne učinkovine. Ujete zdravilnih substance smo nato ovrednotili glede na hitrost in vrsto sproščanja.

1.2 Hipoteze

- 1. Penjenje s superkričnim CO₂ je primerna metoda za pridobitev poroznih struktur
- 2. S pomočjo superkričnega CO₂ je možno pridobiti porozni material in nizke delovne temperature, ki je pomembna da se ohrani aktivna učinkovina
- 3. Kompoziti imajo visoko poroznost (več kot 70%) in v mnogih primerih veliko odprtost por.
- 4. Celuloza v kompozitu ne vpliva na omočenje kompozita s tekočino
- 5. Kompoziti imajo manjša poroznost v primeru sestavljenih struktur kot v primeru čistega polimera PCL
- 6. Ciprofloksacin se sprošča nadzorovano iz kompozitne matrice

2 ZNANSTVENO OZADJE

2.1 Biomateriali in umetni materiali

Biomateriali igrajo danes pomembno vlogo v medicini - obnavljajo funkcijo in olajšujejo zdravljenje ljudi po poškodbi ali bolezni. Biomateriali so lahko naravni ali sintetični in se uporabljajo v medicinskih aplikacijah za podporo, krepitev ali nadomeščanje poškodovanega tkiva ali biološke funkcije. Prva zgodovinska uporaba biomaterialov sega v antiko, ko so stari Egipčani uporabljali šive, narejene iz živalske žile. Sodobno področje biomaterialov združuje medicino, biologijo, fiziko in kemijo ter novejši vplivi tkivnega inženirstva in znanosti o materialih. Področje je v zadnjem desetletju močno naraslo zaradi odkritij v tkivni tehniki, regenerativni medicini in še več.

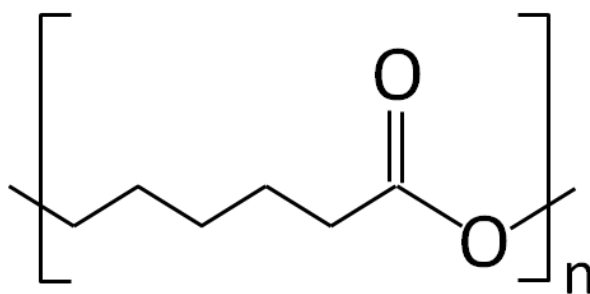
Kovine, keramika, plastika, steklo in celo žive celice in tkiva se lahko uporabijo pri ustvarjanju biomateriala. Preoblikujemo jih lahko v oblikovane ali strojno obdelane dele, prevleke, vlakna, folije, pene in tkanine za uporabo v biomedicinskih izdelkih in napravah. Ti lahko vključujejo srčne zaklopke, zamenjave kolčnih sklepov, zobne vsadke ali kontaktne leče. Pogosto so biorazgradljivi, nekateri pa se absorbirajo v biološkem stanju, kar pomeni, da se postopoma izločijo iz telesa, ko opravijo funkcijo. Biorazgradljivi materiali se trenutno uporabljajo, kot osnova za nastanek medicinskih vsadkov, pospeševanje celjenja človeškega tkiva, molekularne sonde, nanodelce in biosenzorje.

(Biomaterials)

2.2 Polikaprolakton (PCL)

Polikaprolakton (PCL) je biorazgradljiv, polkristalni termoplastični poliestar. Tališče ima približno 60 ° C. V glavnem se uporablja kot dodatek za smole za izboljšanje njihovih lastnosti obdelave in končne uporabe, kot so žilavost, prožnost, nastavitev stiskanja in trdnost trganja. Najpomembnejša uporaba polikaprolaktone (poliolov) je pri izdelavi poliuretanov. Zagotavlja dobro odpornost na olje, gorivo in topila, pa tudi odlično (nizkotemperaturno) prožnost in žilavost. Kot številni drugi alifatski poliestri je tudi PCL združljiv s številnimi termoplastikami. Na primer, lahko ga dodamo kot PVC polimerni mehčalec na PVC, da prinese prožnost. Zaradi zelo nizkega mesta mehčanja najde tudi uporabo kot plastiko za spominjanje. Zmehča do kiti podobne konsistence pri približno 60 ° C in jo je mogoče enostavno oblikovati, kar je uporabno za modeliranje in kot surovina za hitro prototipiranje (3D tiskanje).

(Polycaprolactone)



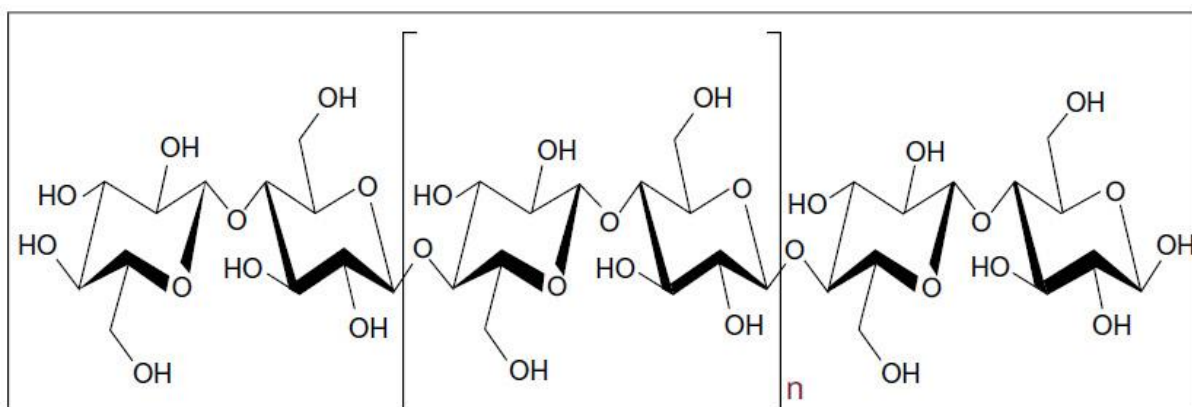
Slika 1: Strukturna formula

(Polycaprolactone)

2.3 Celulozni nanodelci

Celulozni nanokristali, proizvedeni iz različnih naravnih virov, so obnovljivi nanomateriali, ki jih je mogoče uporabiti na različne načine zaradi lastnosti visoke trdnosti in togosti v kombinaciji z majhno težo, biorazgradljivostjo in okoljskimi koristmi, ki izhajajo iz njene uporabe. Celulozni nanokristali so zaradi svoje nanoskali in specifičnih lastnih lastnosti zelo obetavni za uporabo kot ojačitev v visokozmogljivih nanokompozitih s trajnostno privlačnostjo. Veliko biorazgradljivih polimerov se uporablja kot matrica pri izdelavi nanokompozitov. Poleg tega ima nanokristalna celulozna ojačitev glavni cilj, da deluje kot jedro sredstvo, ki povečuje hitrost kristalizacije polimera, in zagotavlja večje mehanske lastnosti, kot so natezna trdnost, Youngov modul in modul skladiščenja.

(Cellulose Nanocrystals)



Slika 2: Strukturna formula Nanoceluloze

(Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications)

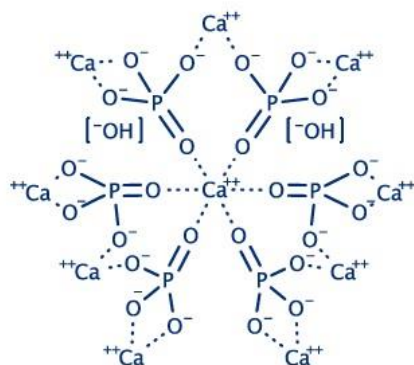
2.4 Hidroksiapatit (HAP)

Hidroksiapatit (HAp) je kalcijev fosfat po morfologiji in sestavi podoben človeškim trdim tkivom. Pomembna značilnost hidroksiapatita je njegova stabilnost v primerjavi z drugimi kalcijevimi fosfati. Termodinamično je hidroksiapatit najbolj stabilna spojina kalcijevega fosfata v fizioloških pogojih, kot so temperatura, pH in sestava telesnih tekočin. Z razvojem nanotehnologije je bil opazen velik vpliv na znanosti o materialih. Proizvodnja nanomaterialov je pritegnila veliko pozornosti pri adsorpciji, katalizi in optičnih aplikacijah, zlasti kadar gre za biomateriale. Nano-hidroksiapatit (nano-HAp) privlači zanimanje kot biomaterial za uporabo v protetičnih aplikacijah zaradi podobnosti velikosti, kristalografije in kemične sestave s človeškim trdim tkivom.

(Hydroxyapatite)

Ker pomaga spodbuditi rast kosti, se nano hidroksiapatit najpogosteje uporablja v operacijah, ki vključujejo kosti in zobno sklenino. Skupne nadomestne vsadke lahko prevlečemo z nano hidroksiapatitom. Telo zato manj verjetno zavrne vsadke, mineralna prevleka pa spodbuja rast novih kosti okoli vsadka in ga učinkoviteje zasidra.

(Common Uses of Hydroxyapatite and How it Can Affect Your Teeth)



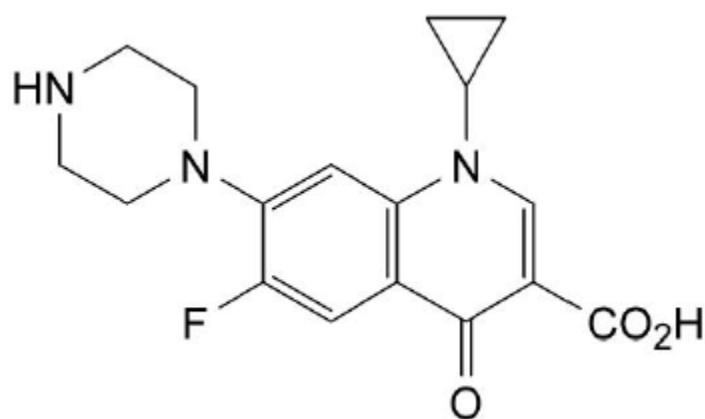
Slika 3: Strukturna formula
Hidroksiapatita

(Nano Hydroxyapatite Powder)

2.5 Ciprofloxacin

Ciprofloksacin se uporablja za zdravljenje različnih vrst bakterijskih okužb, vključno z okužbami kože, kosti in sklepov, okužb dihal ali sinusov, okužb sečil in nekaterih vrst driske. Uporablja se tudi za zdravljenje gonoreje. Ciprofloksacin se uporablja tudi za zdravljenje ljudi, ki so bili izpostavljeni antraksu ali nekaterim vrstam kuge. Ciprofloksacin je treba uporabljati samo za okužbe, ki jih ni mogoče zdraviti z varnejšim antibiotikom. Fluorokinolonski antibiotiki lahko povzročijo resne ali onemogočajo neželene učinke, ki morda niso reverzibilni, na primer ruptura tetive ali težave z živci.

(Ciprofloxacin)



Slika 4: Strukturna formula Ciprofloxacina

(Chemical structure of ciprofloxacin)

2.6 Superkritični CO₂

Za vsako snov je značilna kritična točka, ki jo dobimo v posebnih pogojih tlaka in temperature. Kadar je spojina izpostavljena tlaku in temperaturi, višji od njene kritične točke, naj bi bila tekočina "nadkritična".

V nadkritičnem območju ima tekočina določene deleže in ima vmesno vedenje med tekočino in plinom.

(Supercritical fluids)

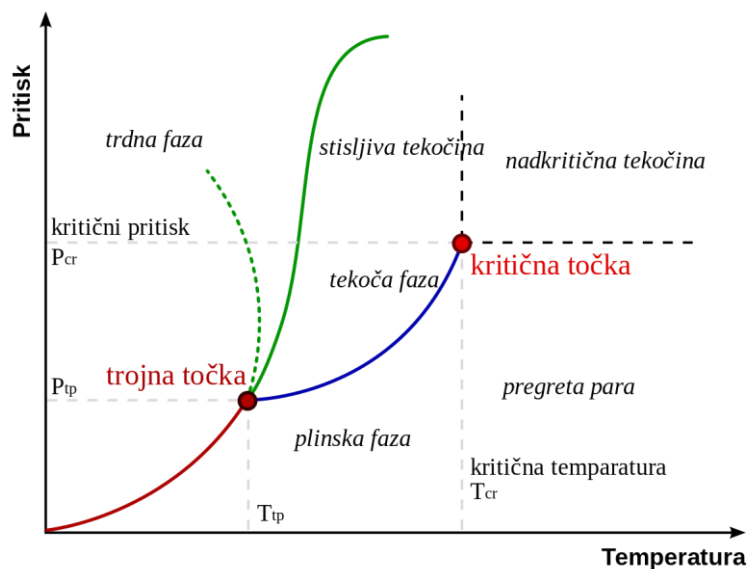
Ker superkritični fluidi ne obremenjujejo okolje, pogosto nadomeščajo organska in toksična topila. (Champeau, 2015, str. 249)

Ogljikov dioksid (CO₂) je najpogosteje uporabljena nadkritična tekočina. To je zato, ker je scCO₂ poceni, netoksičen, negorljiv in zlahka na voljo pri visoki čistosti in nizkih stroških. Kritična točka CO₂ je lahko dostopna, saj ima kritično temperaturo pri 31 ° C in kritični tlak pri 74 bari, kar omogoča uporabo tekočine pri blagih temperaturah (40-60 ° C). Njegova prednost je da pri samem procesu ne sprošča škodljivih organskih ostankov. Zaradi svojih lastnosti superkritični CO₂ imenujemo zeleno topilo.

(Supercritical fluids)

Uporaba superkritičnih fluidov je vse bolj v porastu, saj se uporablja v prehranski, farmacevtski, kozmetični industriji, kemiji in obdelavi odpadkov. Postopki, kjer se scCO₂ uporablja so ekstrakcija, impregnacija, sterilizacija, formulacija, čiščenje in ravnanje z odpadki.

(Perrut, 2000, str. 4532)



Slika 5: Fazni diagram

(Phase diagram)

Fazni diagrami prikazujejo stanje snovi pri različnih temperaturah in tlaku. Stanje snovi predstavlja krivulja. Diagram je sestavljen iz regij, ki predstavljajo trdno, tekočo in plinsko fazo. Trdna in tekoča območja so ločena s talilno krivuljo, tekočine in plini pa so ločeni s krivuljo parnega tlaka, ki se zaključi v kritični točki. Vsaka regija omogoča kombinacijo tlaka in temperature, kjer je določena faza stabilna. Pri standardni temperaturi in tlaku se CO₂ obnaša kot plin. Kadar pa je v trdnem agregatnem stanju je zamrznjen (suhi led). Kakor prikazuje fazni diagram, tekoči CO₂ ne more obstajati pri atmosferskem zraku, kar pomeni, da direktno sublimira v plinasto agregatno stanje.

(Phase Diagrams)

Fazni diagram nam pove, v kakšnem stanju je snov, glede na določeno temperaturo in tlak. Zgolj v točki, kjer je temperatura 216, 6K in tlak 0,518 MPa, vse tri faze obstajajo, to točko pa imenujejo trojna točko (triple point – na grafu).

(Joshi, 2015, str.2)

Ko zvišujemo temperaturo plina, utekočinjanje postaja vse težje, ker so za preseganje povečane kinetične energije molekul potrebni višji in večji pritiski.

Pravzaprav je za vsako snov določena temperatura, nad katero plin ne moremo več utekočiniti, ne glede na pritisk. Ta temperatura je kritična temperatura (T_c), najvišja temperatura, pri kateri lahko snov obstaja kot tekočina. Molekule imajo nad kritično temperaturo preveč kinetične energije za med molekulske privlačne sile, da bi jih držale skupaj v ločeni tekoči fazi. Namesto tega snov tvori eno fazo, ki v celoti zaseda prostornino posode. Snovi z močnimi med molekulskimi silami po navadi tvorijo tekočo fazo v zelo velikem temperaturnem območju in imajo zato visoke kritične temperature. Nasprotno pa imajo snovi s šibkim med molekulskimi interakcijami razmeroma nizke kritične temperature. Vsaka snov ima tudi kritični tlak (P_c), najmanjši tlak, potreben za utekočinjanje pri kritični temperaturi. Kombinacija kritične temperature in kritičnega tlaka se imenuje kritična točka. (critical point- na grafu)

(Phase Diagrams)

3 METODOLOGIJA DELA

Iz pripravljenih zmesi smo v visokotlačni črpalki s pomočjo scCO_2 naredili kompozit, ki so ga uporabljali pri kasnejših analizah. Z elektronskim mikroskopom (ESEM) pa smo pogledali velikost nastalih por in izračunali poroznost materiala.

3.1 Material

- Polikaprolakton (PCL)
- Celulozni nanodelci (CNF)
- Hidroksiapati (Hap)
- Ciprofloxacina
- Cloxacillin
- Superkritični ogljikov dioksid (scCO_2)
- Etil laktat ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$)
- PBS pufer

PBS pufer je raztopina, ki se običajno uporablja v biokemiji in vsebuje natrijev klorid, dinatrijev hidrogen fosfat, kalijev klorid in kalijev dihidrogen fosfat. Za pripravo 1L pufra smo potrebovali 8g NaCl, 0.2g KCl, 1,44g Na_2HPO_4 , 0.24g KH_2PO_4 in 800mL vode (H_2O).

(Phosphate-buffered saline (PBS))

3.2 Priprava poroznega ogrodja s scCO_2

Pred obdelavo s scCO_2 sva pripravila emulzijo iz etil laktata in organskih snovi.

Pripravljala sva več različnih kompozitov. Pripravila sva kompozit iz čistega PCL-ja, nato kompozit, ki ga je sestavljalo 90% PCL-ja in 10% celuloznih nanodelcev, potem kompozit, ki je sestavljen iz 70% PCL-ja in 30% celuloznih nanodelcev. Nazadnje sva pripravila še kompozit, ki ga sestavlja 80% PCL-ja ter 10% celuloznih nanodelcev in 10% Hap-a. Proces še dvakrat ponovimo vendar dodamo 5% zdravilne učinkovine ciprofloxacina oziroma cloxacillin. Zaradi dodatka zdravila se vsebnost PCL-ja v zmesi zmanjša za 5%.

Ker sva imeli dve fazi snovi, ki se med sabo ne mešata, sva s pomočjo digitalnega ultrazvočnega čistilnika lahko tvorila emulzijo etil laktata in organskih snovi. Nato sva snovi segrela in homogenizirala s homogenizatorjem. Homogenizirane zmesi sva prelila v valjaste kalupe in jih postavila v visokotlačni reaktor pri 150barih. V visokotlačnem reaktroju je bila konstanta temperatura 37°C odstopanje temperature je bilo $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ odstopanje tlaka pa ± 10 barov. Ko sva dosegla željen tlak 150 barov sva skozi visokotlačni reaktor s pomočjo črpalke spustila csCO_2 , da bi iz pripravljenih zmesi v celoti ekstrahirala etil laktat. Ekstrahirala sva 10 ur. Pod visokim tlakom se je biorazgradljiv polimer utekočnil, tako da so se vanj ujeli netopni biorazgradljivi delci. Nastale kompozite sva po odprtju kalupa odstranila jih razrezala na tri enako velike valje, vzorce pa sva kasneje uporabljala za nadaljnje poskuse, kjer sva merila sproščanje, kontaktne kote, FTIR analize in preračunavala poroznost materialov. (Hile, 2000, str. 179,180)



Slika 6: Visokotlačni reaktor

(Korenak, Matjaž)

3.3 Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop

Z uporabo okoljskega skenirajočega elektronskega mikroskopa (ESEM) sva določila velikost por, ki so nastale na ogradjah s scCO_2 . Namen uporabe ESEM je pri zelo velikih povečavah, pod zelo variabilnim stanjem vakuumu v komori vzorca izdelati slike površinskih značilnosti vzorca. Vzorce lahko tako pogledamo pod zelo podobnimi pogoji, kot so bili v vzorcu v naravi.

(Manero in sod, 2003, str.469)



Slika 7: Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop

(Korenak, Matjaž)

3.4 Poroznost materialov

Poroznost novonastalih kompozitov smo merili po naslednji formuli.

$$\text{Poroznost [\%]} = \frac{(w_2 - w_3 - w_s) / \rho_e}{(w_1 - w_3) / \rho_e} \times 100$$

kjer je:

w_1 – masa valjaste posode in etanol

w_2 – masa valjaste posode + etanol + masa biorazgradljivega kompozita

w_3 – masa valjaste posode + etanol po odvzemu poroznega biorazgradljivega materiala

w_s – masa poroznega biomateriala

ρ_e – gostota etanola pri sobni temperaturi

(Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis)

3.5 Kontaktni koti

S pomočjo določitve kontaktnih kotov kapljice na biorazgradljiv material, sva določala hidrofobnost in hidrofilnost kompozitov. S samo sestavljenim sistemom sva naredili posnetke kontaktnih kotov. Za lažjo predstavo, sva priložila sliko samega mehanizma.



Slika 8: Aparatura za merjenje kontaktnih kotov

(Korenak, Matjaž)

3.6 FTIR analiza

Vsako molekule lahko prepoznamo po njenem značilnem absorpcijskem spektru, saj vsaka molekula absorbira infrardeče žarke pri svojih edinstvenih frekvencah. Vsaka molekularna struktura ima edinstveno kombinacijo atomov in zato proizvaja edinstven spekter, kadar jo izpostavimo infrardeči svetlobi. Razlikujemo lahko celo molekule z enakim številom atomov v različnih položajih. Edine izjeme so dvoatomni elementi, kot sta O_2 in žlahtni plini, ki infrardečih žarkov ne absorbirajo. Infrardeči absorpcijski spekter je mogoče obravnavati kot prstni odtis, značilen za vsako molekulo.

(FTIR – Fourier Transform Infrared)

3.7 Sproščanje aktivne učinkovine iz biomateriala

V deset manjših posodic sva odpipetirala 5mL fosfatnega pufru (PBS) in vsako posodico dodala po en vzorec kompozitnega materiala. Vzorce sva zložila v večjo posodo in vse skupaj postavila na stresalnik pri stalni temperaturi 37°C. Po 5 min sva vzorce odpipetirala v mikrocentrifugirke, jih označila in jih zložila v stojalo. V posodice sva ponovno odpipetirala 5mL fosfatnega pufru (PBS) postavila na stresalnik pri stalni temperaturi 37°C in pustila 10 min. Postopek sva ponovila tudi za 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min in 300 min. Ko sva pridobila vse vzorce sva izmerila sproščanje zdravilnih učinkovin iz kompozitnih materialov.

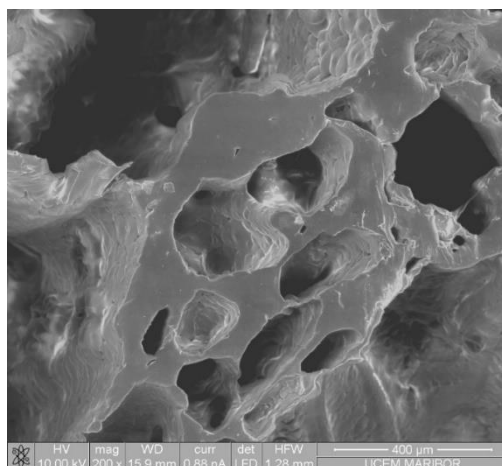


Slika 9: Epruvete za opravljanje testa sproščanja

(Korenak, Matjaž)

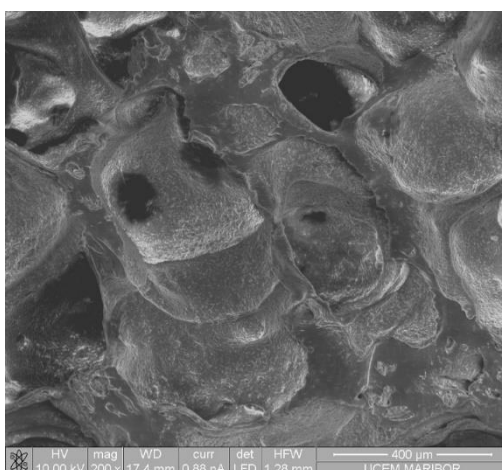
4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Okoljski skenirajoč elektronski mikroskop



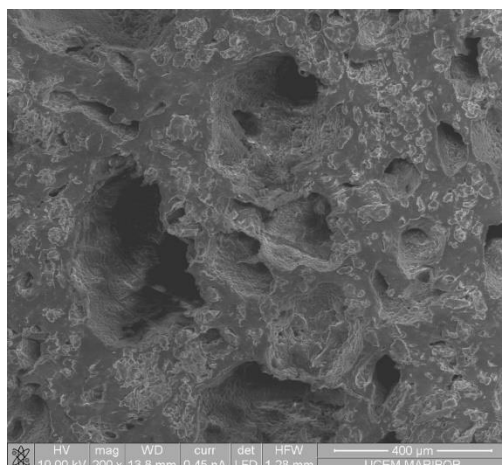
Slika 11:PCL

(Korenak, Matjaž)



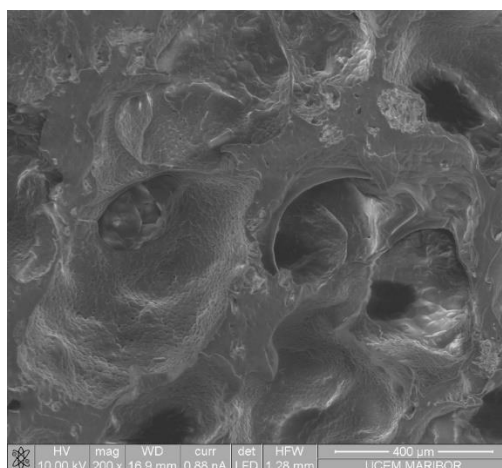
Slika 12: PCL+10%celuloza+10%Hap

(Korenak, Matjaž)



Slika 13: PCL+ 30% celuloza

(Korenak, Matjaž)



Slika 14: PCL+10% celuloza

(Korenak, Matjaž)

S pomočjo slik, ki smo jih pridobili z uporabo okoljskega skenirajočega elektronskega mikroskopa lahko razberemo, da imajo si ustvarjeni kompoziti, velik delež, dobro odprtih por, velikih med 200µm in 400 µm. Velikost por tudi potrjuje dobro poroznost materiala, ki je v vseh primerih precej visoka, razen v primeru, kjer smo uporabili Hidroksiapatit, kar je moč opaziti tudi na sliki.

4.2 Poroznost

POROZNOST KOMPOZITOV

Tabela 1: Masa valjaste posode in etanol

masa valjaste posode in etanol - w_1	masa
PCL	16,3646g
PCL + 10% celuloze	16,0741g
PCL + 30% celuloze	15,4901g
PCL + 10% celuloze + 10% Hap	15,7413g

Tabela 2: masa valjaste posode + etanol + masa biorazgradljivega kompozita

masa valjaste posode + etanol + masa biorazgradljivega kompozita – w_2	masa
PCL	16,6670g
PCL + 10% celuloze	16,5696g
PCL + 30% celuloze	16,0370g
PCL + 10% celuloze + 10% Hap	16,0785g

**Tabela 3: masa valjaste posode + etanol po odvzemu poroznega
biorazgradljivega materiala**

masa valjaste posode + etanol po odvzemu poroznega biorazgradljivega materiala – w_3	masa
PCL	15,1267g
PCL + 10% celuloze	16,2287g
PCL + 30% celuloze	15,8116g
PCL + 10% celuloze + 10% Hap	15,3044g

Tabela 4: masa poroznega biomateriala

masa poroznega biomateriala – w_s	masa
PCL	0,5401g
PCL + 10% celuloze	0,5522g
PCL + 30% celuloze	0,5075g
PCL + 10% celuloze + 10% Hap	0,4952g

$$\text{Poroznost (PCL)} = \frac{(w_2 - w_3 - w_s) / \rho_e}{(w_1 - w_3) / \rho_e} \times 100\% = 80,7981\%$$

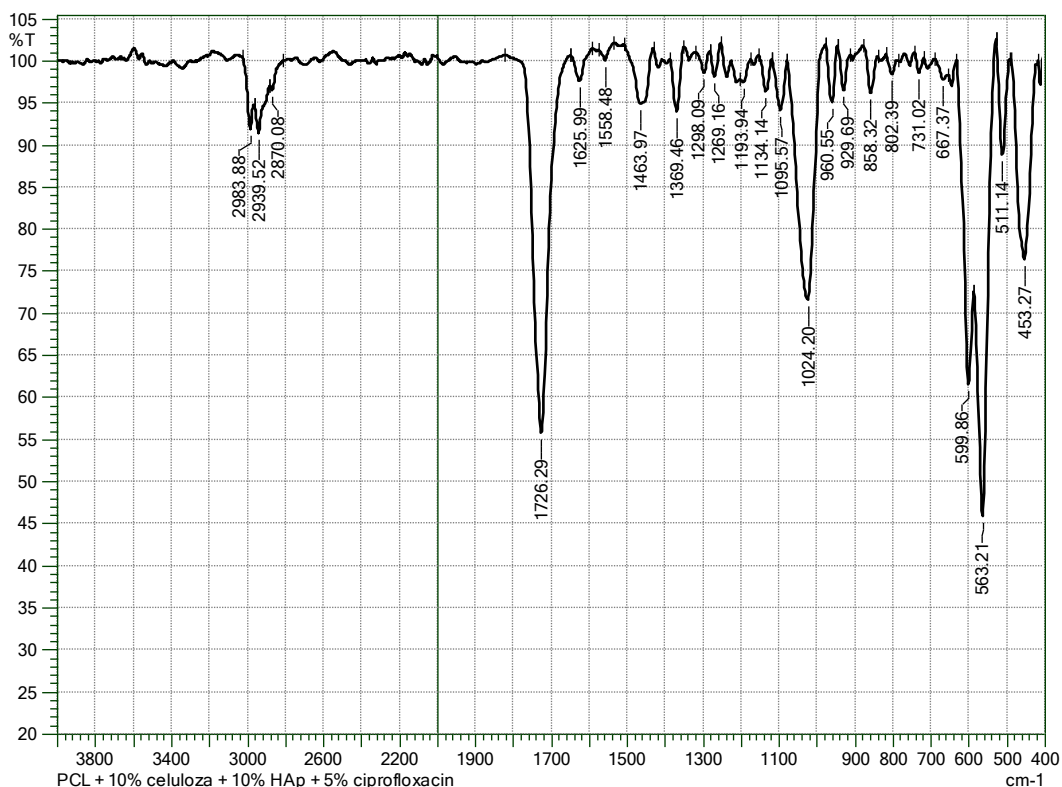
$$\text{Poroznost (PCL + 10\% celuloza)} = \frac{(w_2 - w_3 - w_s) / \rho_e}{(w_1 - w_3) / \rho_e} \times 100\% = 90,4626\%$$

$$\text{Poroznost (PCL + 30\% celuloza)} = \frac{(w_2 - w_3 - w_s) / \rho_e}{(w_1 - w_3) / \rho_e} \times 100\% = 87,7449\%$$

$$\text{Poroznost (PCL + 10\% celuloza + 10\% Hap)} = \frac{(w_2 - w_3 - w_s) / \rho_e}{(w_1 - w_3) / \rho_e} \times 100\% = 64,0650\%$$

Kakor je razvidno iz navedenih podatkov, smo najvišjo stopnjo poroznosti dosegli, ko smo v kompozitu, kjer smo dodali 10% celuloze, kjer je bil poroznost nekaj več kot 90%. Ugotovili smo, da poroznost močno zmanjša Hidroksiapatit, saj se je poroznost tega kompozita zmanjšala za 26%.

4.3 FTIR analiza

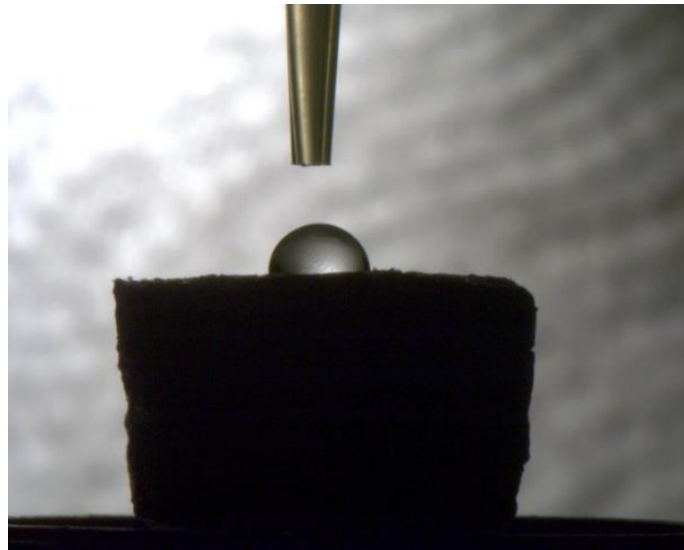


Slika 15: FTIR analiza PCL+10%celuloze+10%Hap+ciprofloxacin

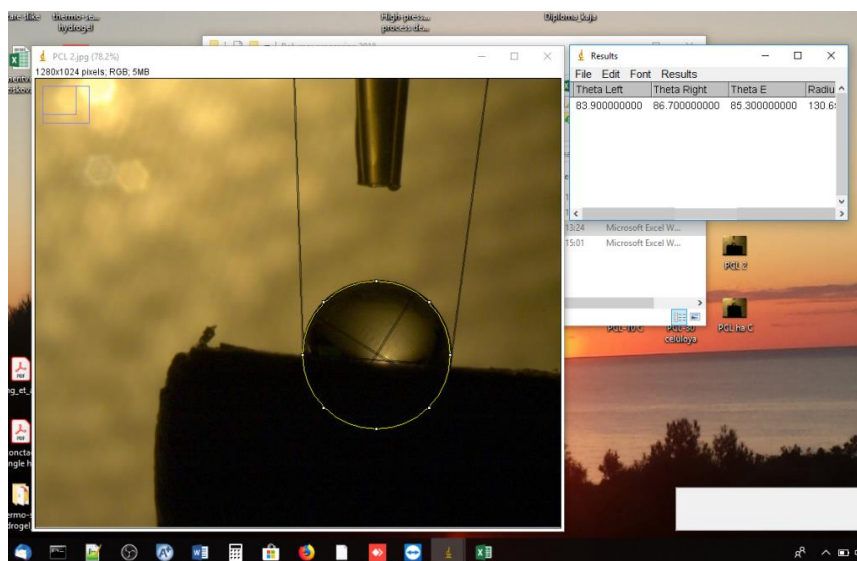
(Korenak, Matjaž)

Spektrometer smo naredili samo za en primer kompozita, v katerem smo uporabili vse komponente. Kristaličnost kompozita se kaže pri vrhovih v območju med 700 in 500 cm^{-1} . Vrh pri valovni dolžini 1726,29 cm^{-1} prikazuje povezavo dveh vezi: C-C-H in O-C-H. Vrh pri valovni dolžini 1024,20 cm^{-1} je posledica raztezanja C-O vezi. S to analizo smo potrdili prisotnost vseh komponent, ki smo jih uporabili v sami mešanici, torej v samem procesu nastajanja nismo izgubili nobenega materiala.

4.4 Kontaktni kot



Slika 16: Analiza kontaktnih kotov; PCL+10% celuloza
(Korenak, Matjaž)



Slika 17: Analiza kontaktnega kota; PCL
(Korenak, Matjaž)

Tabela 5: Kontaktni koti

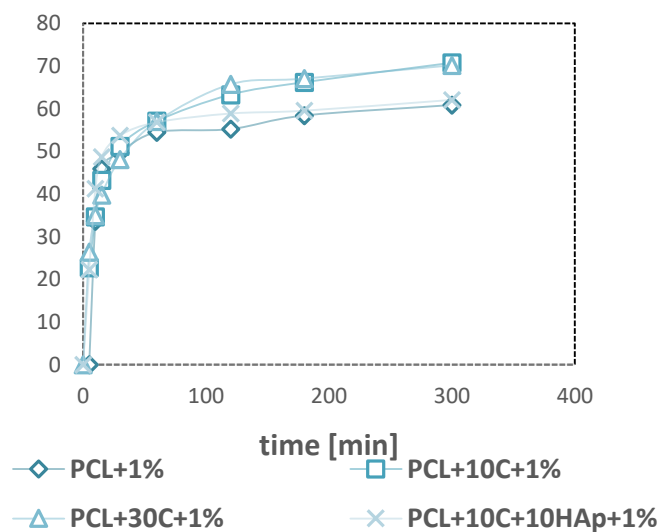
material	Kontaktni kot	napaka
PCL	90.52	0.3
PCL + 10(w/w)% nC	80.77	0.82
PCL + 30 (w/w)% nC	45.60	0.57
PCL + 10(w/w)% nC + 10(w/w) Hap	98.51	0.89

S pomočjo kontaktnih kotov smo ugotovili, da najpomembnejšo vlogo pri zmanjšanju kontaktnih kotov, pri čemer dosežemo boljšo hidrofilnost materiala, predstavlja dodatek celuloze. Namreč ob dodatku 30% koncentracije celuloze, se je kontaktni kot zmanjšal za 45°. Seveda smo strmeli k temu, da bi dosegli dobro omočenje materiala, saj to pomeni, da učinkovina lažje dostopa do celic. To je ključno, saj ta material predstavlja umetni hrustanec ali del kosti.

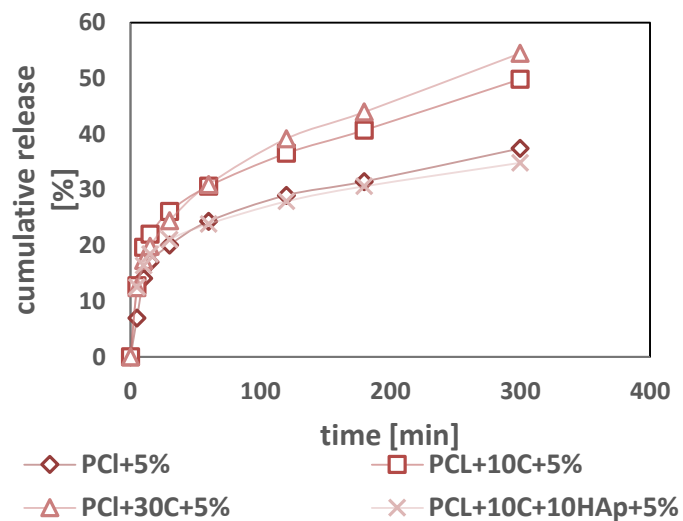
Kontaktne kote smo analizirali s programom ImageJ.

Vir: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=iamge+i>

4.5 Testi sproščanja aktivne učinkovin



Slika 18: Graf sproščanja 1% koncentracije zdravilne učinkovine iz kompozitov



Slika 19: Graf sproščanja 5% koncentracije zdravilne učinkovine iz kompozitov

Kakor je razvidno iz grafa sproščanja, kadar smo uporabili 1% koncentracijo ciprofloksacina, se je v vseh primerih večina učinkovine sprostila v prvi uri po začetku

delovanja, medtem ko je bilo sproščanje v primeru 5% koncentracije ciprofloksacina veliko bolj postopno. Kot je razvidno, se je pri 1% koncentraciji v eni uri sprostilo okoli 50% učinkovine, pri 5% koncentraciji pa se je sprostilo pol manj učinkovine v istem času.

5 ZAKLJUČEK

Z dobljenimi rezultati pa sva ovrednotila zastavljene hipoteze.

Prvo hipotezo, ki se glasi »Penjenje s supekritičnim CO₂ je primerna metoda za prodobitev poroznih struktur«, sva potrdila, saj sva tekom raziskovanja dobila stabilne kompozite, ki nimajo škodljivih učinkov na organizem, prav tako pa so dobro porozni, kar sva tudi želela doseči.

Drugo hipotezo, ». S pomočjo superkritičnega CO₂ je možno pridobiti porozni material na nizki delovni temperaturi, ki je pomembna, da se ohrani aktivna učinkovina«, sva tudi potrdila, saj so nastali kompoziti izjemno porozni, kar sva dokazala s testi poroznosti, kjer imajo vsi kompoziti več kot 65% poroznost, kar je nujno za prehajanje zdravilnih učinkovin v celice. Pomembno je bilo to, da sva vse poskuse opravljala na temperaturi 37°C, ki predstavlja telesno temperaturo človeka, pri tem pa nisva uničila zdravilne učinkovine, kar smo potrdili s testi sproščanja.

Naslednjo hipotezo, ki se glasi »Kompoziti imajo visoko poroznost (več kot 70%) in v mnogih primerih veliko odprtost por«, sva delno potrdila, saj kakor je razvidno iz slik okoljskega skenijuročega elektronskega mikroskopa, vidimo, da so pore velike med 200 µm in 400 µm. Poroznost pa niha med 90% in 65% in zaradi 5%-ga odstopanja v enem izmed kompozitov hipoteze nisva mogla v celoti potrditi.

Četrto hipotezo ki pravi »Celuloza v kompozitu ne vpliva na omočenje kompozita s tekočino«, sva tudi zavrnila, saj so vsi kompoziti, ki niso imeli dodane celuloze, večje kote, kar pa pomeni da so bili veliko bolj hidrofolni, kot pa kompoziti, ki so vključevali celulozo. Namreč kompozit, ki je vseboval 10% celuloze je imel za 35° večji kot, kot pa kompozit z 30% celuloze. Torej celuloza odločilno vpliva na hidrofolni oz. hidrofilni značaj kompozita.

Peto hipotezo, ki se glasi »Kompoziti imajo manjša poroznost v primeru sestavljenih struktur kot v primeru čistega polimera PCL«, sva zavrnila, saj kakor je razvidno iz rezultatov poroznosti, je bila poroznost za cca. 10% večja pri kompozitih, ki so vključevali PCL in celulozo. Poroznost pri čistem PCL je bila približno 80%, pri kompozitih s celulozo pa se je zvišala.

Zadnjo hipotezo, ki se glasi »Ciprofloksacin se sprošča nadzorovano iz kompozite matrice«, sva tudi potrdila, saj sva dosegla postopno sproščanje zdravilne učinkovine. Sproščanje le te, je se bolj kontrolirano v primeru, ko smo povečali koncentracijo zdravilne učinkovine. S kontroliranim sproščanjem sva dosegla, da se

iz kompozita, katerega namen je ta, da lokalno zavira nastanek infekcije, sproščanje poteka dlje časa, s čimer se poveča tudi uporabnost kompozita.

Raziskovalno nalogo bi se dalo izboljšati in nadgraditi. To načrtujeva z prihodnjim delom, kjer bi izvedla še teste biokompatibilnosti in in vitro teste, s katerimi bi dobila še bolj podrobne in zanesljive rezultate, ki nam bi pokazali funkcionalnost nastalih kompozitov v resničnem življenju.

Ob opravljanju raziskovalne naloge sva pridobila številne reference, predvsem to da sva se seznanila z načini raziskovanja, kako se lotiti problema in ga samostojno izpeljati. Vedela sva, kako poteka delo v laboratoriju in se srečala s številnimi neznanimi kemikalijami.

6 VIRI IN LITERATURA

- Biomaterials. [online]. 2020. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials#pid-5111>
- Polycaprolactone. [online]. 2020. Polymer Properties Database. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani: <http://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/PCL.html>
- Cellulose Nanocrystals. [online]. 2020.Science direct. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/cellulose-nanocrystals>

- Hydroxyapatite. [online]. 2020.Fluidinova. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:<https://www.fluidinova.com/hydroxyapatite-properties-uses-and-applications>
- Common Uses of Hydroxyapatite and How it Can Affect Your Teeth. [online]. 2020. Carifree. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:<https://carifree.com/2018/07/19/common-uses-of-hydroxyapatite-and-how-it-can-affect-your-teeth/>

- Ciprofloxacin. [online]. 2020. Drugs.com. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:<https://www.drugs.com/ciprofloxacin.html>

- Supercritical fluids. [online]. 2020.Supercritical fluid.org. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:<http://www.supercriticalfluid.org/Supercritical-fluids.146.0.html>

- Champeau, Mathilde, e tal. »Drug loading of polymer implants by supercritical CO₂ assisted impregnation: a review.«. Journal of controlled release 209. (2015): 248-259.

- Perrut, Michael. » Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues«. Industrial and engineering chemistry research 39.12 (2000): 4531-4535

-Phase Diagrams. [online]. 2020.Chem.libretexts.org. [Citirano 20. feb. 2020].
Dostopno na

strani:[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3AGeneral_Chemistry_\(Petrucci_et_al.\)/12%3A_Intermolecular_Forces%3ALiquids_And_Solids/12.4%3A_Phase_Diagrams](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Map%3AGeneral_Chemistry_(Petrucci_et_al.)/12%3A_Intermolecular_Forces%3ALiquids_And_Solids/12.4%3A_Phase_Diagrams)

-Joshi Y. 2015. A seminar report on supercritical fluids and its application. Seminar.
Anmedabad, Institute of technology

- Phosphate-buffered saline (PBS). [online]. 2020.Cold Spring Harbor Protocols.
[Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na
strani:<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247>

-Manero, J. M., e tal. »Applications of environmental scanning electron microscopy (ESEM) in biomaterials field«. Microscopy research and technique 61.5 (2003): 469 - 480.

-Hile, David D., e tal, » Active growth factor delivery from poly (D, L-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO₂«. Journal of controlled release 66.2-3 (2000): 177 -185.

- Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. [online]. 2020. Science direct. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na
strani:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205001511>

- FTIR – Fourier Transform Infrared. [online]. 2020.Gasmet. [Citirano 20. feb. 2020].
Dostopno na strani:<https://www.gasmet.com/products/ftir-fourier-transform-infrared/>

7 VIRI SLIK

- Polycaprolactone. [online]. 2020.Merck. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polycaprolactone1234598765?lang=en®ion=US>

-Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications. [online]. 2020.Dovepress. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:
<https://www.dovepress.com/cellulose-nanocrystals-synthesis-functional-properties-and-application-peer-reviewed-fulltext-article-NSA>

- Nano Hydroxyapatite Powder . [online]. 2020.EPRUI Biotech Co. Ltd. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:<https://www.chromospheres.com/nano-hydroxyapatite-powder/>

-Chemical structure of ciprofloxacin . [online]. 2020. Research Gate. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-ciprofloxacin_fig1_257652783

- Phase diagram. [online]. 2020. Wikipedia. [Citirano 20. feb. 2020]. Dostopno na strani:https://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:Phase-diag_sl.svg

-Korenak, Matjaž. 1. 7. 2019 – 5. 8. 2019