

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ZORAN KUPLJEN

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE NANOVLAKEN IZ  
POLIETILENOKSIDA IZDELANIH Z METODO  
ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA**

**FORMULATION AND EVALUATION OF POLY-(ETHYLENE OXIDE)  
NANOFIBERS BY ELECTROSPINNING**

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner.

**Zahvala**

*Iskrena hvala Romani Rošic, mag. farm., za izdatno pomoč, nasvete, ažurnost ter potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge.*

*Za strokovne nasvete in dosegljivost se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner. Hvala tudi Janu Pelipenku, mag. farm., za pomoč v laboratoriju ter doc. dr. Petri Kocbek za opravljeno elektronsko mikroskopiranje.*

*Na koncu pa bi se rad zahvalil svojim staršem, puncu Nataliji ter sošolcem in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani ter me podpirali.*

**Izjava:**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner.

Ljubljana, april 2012

Zoran Kupljen

**Diplomska komisija:**

Predsednik: izr. prof. dr. Marija Bogataj

Mentorica: izr. prof. dr. Saša Baumgartner

Član: doc. dr. Tomaž Bratkovič

# KAZALO VSEBINE

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>KAZALO VSEBINE</b>                                   | <b>3</b>  |
| <b>KAZALO SLIK</b>                                      | <b>5</b>  |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC</b>                                | <b>7</b>  |
| <b>POVZETEK</b>                                         | <b>8</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>                                         | <b>10</b> |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>                                  | <b>12</b> |
| <b>1. UVOD</b>                                          | <b>13</b> |
| <b>1. 1. Nanovlakna</b>                                 | <b>13</b> |
| 1. 1. 1. Uporaba nanovlaken                             | 13        |
| 1. 1. 2. Metode za izdelavo nanovlaken                  | 15        |
| 1. 1. 3. Vrednotenje nanovlaken                         | 19        |
| <b>1. 2. Elektrostatsko sukanje</b>                     | <b>19</b> |
| 1. 2. 1. Razvoj elektrostatskega sukanja                | 19        |
| 1. 2. 2. Prednosti elektrostatskega sukanja             | 20        |
| 1. 2. 3. Mehanizem elektrostatskega sukanja             | 20        |
| <b>1. 3. Spremenljivke</b>                              | <b>22</b> |
| 1. 3. 1. Lastnosti polimerne raztopine                  | 22        |
| 1. 3. 2. Procesni parametri                             | 25        |
| 1. 3. 3. Vplivi okolja                                  | 29        |
| <b>1. 4. Proučevani polimeri za izdelavo nanovlaken</b> | <b>31</b> |
| 1. 4. 1. Polietilenoksid (PEO)                          | 31        |
| 1. 4. 2. Hitosan (CH)                                   | 32        |
| <b>2. NAMEN DELA</b>                                    | <b>34</b> |
| <b>3. MATERIALI IN METODE</b>                           | <b>35</b> |
| <b>3. 1. Materiali</b>                                  | <b>35</b> |
| 3. 1. 1. Polimeri za pripravo raztopin in nanovlaken    | 35        |
| 3. 1. 2. Reagenti za pripravo fosfatnega pufra          | 35        |
| 3. 1. 3. Topila za pripravo raztopin in pufra           | 35        |
| 3. 1. 4. Reagenti za stabilizacijo                      | 35        |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. 2. Naprave</b>                                                      | <b>35</b> |
| <b>3. 3. Postopki in metode</b>                                           | <b>36</b> |
| 3. 3. 1. Priprava polimernih raztopin                                     | 36        |
| 3. 3. 2. Elektrostatsko sukanje                                           | 37        |
| 3. 3. 3. Vrednotenje izdelanih nanovlaken                                 | 37        |
| 3. 3. 4. Priprava fosfatnega pufra (PBS)                                  | 38        |
| 3. 3. 5. Stabilizacija izdelanih nanovlaken                               | 38        |
| 3. 3. 6. Spremljanje hidratacije izdelanih nanovlaken                     | 39        |
| <b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b>                                           | <b>40</b> |
| <b>4. 1. Izbor raztopin in določanje pogojev elektrostatskega sukanja</b> | <b>40</b> |
| <b>4. 2. Vrednotenje izdelanih nanovlaken</b>                             | <b>41</b> |
| 4. 2. 1. Vpliv uporabljene električne napetosti                           | 41        |
| 4. 2. 1. 1. PEO molekulske mase 400.000 g/mol                             | 42        |
| 4. 2. 1. 2. PEO molekulske mase 900.000 g/mol                             | 46        |
| 4. 2. 2. Vpliv koncentracije polimerne raztopine                          | 49        |
| 4. 2. 3. Vpliv molekulske mase polimera                                   | 53        |
| 4. 2. 4. Vpliv deleža dodanega hitosana                                   | 55        |
| <b>4. 3. Stabilizacija izdelanih nanovlaken</b>                           | <b>58</b> |
| 4. 3. 1. Stabilizacija z netopili                                         | 58        |
| 4. 3. 2. Termična stabilizacija                                           | 59        |
| 4. 3. 3. Stabilizacija z glutaraldehidom                                  | 59        |
| <b>4. 4. Stopnja in hitrost hidratacije stabiliziranih nanovlaken</b>     | <b>60</b> |
| <b>5. SKLEP</b>                                                           | <b>65</b> |
| <b>6. LITERATURA</b>                                                      | <b>67</b> |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 1:</b> Nanovlakna iz polietilenoksida (PEO) posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), povečava <b>10.000 X</b> .                                                                                                                     | 13 |
| <b>Slika 2:</b> Področja uporabe polimernih nanovlaken (2).                                                                                                                                                                                             | 14 |
| <b>Slika 3:</b> Pridobivanje nanovlaken s postopkom vleka (1).                                                                                                                                                                                          | 16 |
| <b>Slika 4:</b> Pridobivanje nanovlaken z uporabo nanoporozne membrane (1).                                                                                                                                                                             | 17 |
| <b>Slika 5:</b> Pridobivanje nanovlaken s postopkom fazne separacije (1).                                                                                                                                                                               | 18 |
| <b>Slika 6:</b> Primer spontane tvorbe nanovlaken iz monomerov (na sliki levo), ki so običajno majhne molekule (1).                                                                                                                                     | 18 |
| <b>Slika 7:</b> Shema aparature za elektrostatsko sukanje (7).                                                                                                                                                                                          | 21 |
| <b>Slika 8:</b> SEM slika PEO nanovlaken z vozli (označeni z rdečo barvo).                                                                                                                                                                              | 22 |
| <b>Slika 9:</b> Nastanek vozlov: A- pri višji viskoznosti so molekule topila razporejene med prepletenimi molekulami polimera. B- pri nižji viskoznosti pa se molekule topila začnejo združevati zaradi vpliva površinske napetosti (1).                | 24 |
| <b>Slika 10:</b> Vpliv naraščajoče električne napetosti na obliko in velikost Taylorjevega stožca (8).                                                                                                                                                  | 26 |
| <b>Slika 11:</b> Različni tipi zbiral: A- vrteče vreteno, B- vrteč valj, C- vrteč boben, D- vrteč disk (1).                                                                                                                                             | 29 |
| <b>Slika 12:</b> Strukturna formula polietilenoksida.                                                                                                                                                                                                   | 31 |
| <b>Slika 13:</b> Strukturna formula hitosana.                                                                                                                                                                                                           | 32 |
| <b>Slika 14:</b> Aparatura za elektrostatsko sukanje. 1 - generator visoke električne napetosti, 2 - plastična komora, 3 - črpalka, 4 - kovinska igla, 5 - zbiralo.                                                                                     | 36 |
| <b>Slika 15:</b> Shematski prikaz poteka kemijskega premreženja hitosana z uporabo glutaraldehida (33).                                                                                                                                                 | 39 |
| <b>Slika 16:</b> SEM slika kapljic na zbiralu pri povečavi <b>5.000</b> -krat, po elektrostatskem sukanju <b>2 %</b> raztopine <b>PEO 400k</b> pri napetosti <b>10 kV</b> .                                                                             | 42 |
| <b>Slika 17:</b> SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>4 % raztopine PEO 400k</b> pri različnih napetostih. Od leve proti desni <b>10kV, 15kV, 20kV in 25kV</b> pri <b>20.000</b> -kratni povečavi.                                               | 43 |
| <b>Slika 18:</b> SEM slika razcepljenih vlaken, ki so posledica tvorbe sekundarnih curkov med elektrostatskim sukanjem (označena z rdečo). Vlakna so izdelana iz raztopine <b>4 % PEO 400k</b> pri napetosti <b>25 kV</b> , povečava: <b>50.000 X</b> . | 44 |
| <b>Slika 19:</b> SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>5 % raztopine PEO 400k</b> , pri različnih napetostih. Od leve proti desni <b>10kV, 15kV, 20kV in 25kV</b> pri <b>10.000</b> -kratni povečavi.                                             | 45 |
| <b>Slika 20:</b> SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>6 % raztopine PEO 400k</b> pri različnih napetostih. Od leve proti desni <b>10kV, 15kV, 20kV in 25kV</b> pri <b>10.000</b> -kratni povečavi.                                               | 45 |
| <b>Slika 21:</b> SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>4 % raztopine PEO 900k</b> pri različnih napetostih. Od leve proti desni <b>10kV, 15kV, 20kV in 25kV</b> pri <b>10.000</b> -kratni povečavi.                                               | 47 |
| <b>Slika 22:</b> SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>5 % raztopine PEO 900k</b> pri različnih napetostih. Od leve proti desni <b>10kV, 15kV, 20kV in 25kV</b> pri <b>10.000</b> -kratni povečavi.                                               | 48 |
| <b>Slika 23:</b> SEM slike vlaken in vozlov pri <b>10.000</b> -kratni povečavi, izdelanih pri napetosti <b>15 kV</b> iz polimernih raztopin <b>PEO 900k</b> različnih koncentracij - od leve proti desni: <b>0.5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %</b> .       | 52 |

**Slika 24:** SEM slike vlaken in vozlov pri **10.000**-kratni povečavi, izdelanih pri napetosti **20 kV** iz polimerne raztopine **PEO 400k** in **hitosana** celokupne koncentracije **3 %** z različnimi deleži hitosana - od leve proti desni, **PEO:CH – 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 93:7, 97:3**. \_\_\_\_\_ 57

**Slika 25:** SEM slike vzorca vlaken, izdelanih iz **5 %** polimerne raztopine **PEO 400k** pri **25 kV**, pred (levo) in po stabilizaciji z **etanolom** (sredina) in **metanolom** (desno) ter spiranjem s fosfatnim pufrom, pH 7,4. Povečava: **5.000 X**. \_\_\_\_\_ 59

**Slika 26:** SEM slike vlaken, izdelanih pri napetosti **20 kV** iz **3 %** polimerne raztopine **PEO 400k** in **hitosana** v masnem razmerju **90:10**, pred (levo) in po (desno) stabilizaciji z **glutaraldehydom**. Povečava: **10.000 X**. 60

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Preglednica 1:</b> Nabor izbranih raztopin <b>PEO 400k</b> , zbran v preglednici, iz katere je razvidno, katere raztopine so sposobne tvoriti stabilen curek. Dodatno je razviden tudi potreben pretok polimerne raztopine pri določenih napetostih v <b>mL/h</b> . | 40 |
| <b>Preglednica 2:</b> Nabor izbranih raztopin <b>PEO 900k</b> , zbran v preglednici iz katere je razvidno, katere raztopine so sposobne tvoriti stabilen curek. Dodatno je razviden tudi potreben pretok polimerne raztopine pri določenih napetostih v <b>mL/h</b> .  | 41 |
| <b>Preglednica 3:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>4 % raztopine PEO 400k</b> , v odvisnosti od napetosti.                                                                                                                                                 | 43 |
| <b>Preglednica 4:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>5 % raztopine PEO 400k</b> , v odvisnosti od napetosti.                                                                                                                                                 | 44 |
| <b>Preglednica 5:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>6 % raztopine PEO 400k</b> , v odvisnosti od napetosti.                                                                                                                                                 | 45 |
| <b>Preglednica 6:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>4 % raztopine PEO 900k</b> , v odvisnosti od napetosti.                                                                                                                                                 | 47 |
| <b>Preglednica 7:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>5 % raztopine PEO 900k</b> , v odvisnosti od napetosti.                                                                                                                                                 | 48 |
| <b>Preglednica 8:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin <b>PEO 400k</b> različnih koncentracij pri napetosti <b>10 kV</b> .                                                                                                                    | 50 |
| <b>Preglednica 9:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin <b>PEO 400k</b> različnih koncentracij pri napetosti <b>15 kV</b> .                                                                                                                    | 51 |
| <b>Preglednica 10:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin <b>PEO 400k</b> različnih koncentracij pri napetosti <b>20 kV</b> .                                                                                                                   | 51 |
| <b>Preglednica 11:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin <b>PEO 400k</b> različnih koncentracij pri napetosti <b>25 kV</b> .                                                                                                                   | 51 |
| <b>Preglednica 12:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin <b>PEO 900k</b> različnih koncentracij pri napetosti <b>15 kV</b> .                                                                                                                   | 52 |
| <b>Preglednica 13:</b> Primerjava premerov vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>4 %</b> polimernih raztopin <b>PEO 400k</b> in <b>PEO 900k</b> pri različnih napetostih.                                                                                                  | 54 |
| <b>Preglednica 14:</b> Primerjava premerov vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>5 %</b> polimernih raztopin <b>PEO 400k</b> in <b>PEO 900k</b> pri različnih napetostih.                                                                                                  | 54 |
| <b>Preglednica 15:</b> Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz <b>3 %</b> polimerne raztopine, mešanice <b>PEO 400k</b> in <b>hitosana</b> v različnih masnih razmerjih.                                                                                                 | 57 |

## POVZETEK

Nanovlakna so trdna vlakna, izdelana iz različnih polimerov, ki zaradi zmanjšanja velikosti na nanometrski nivo izkazujejo izboljšane kemijske in fizikalne lastnosti; med njimi ogromno površino na enoto volumna oziroma mase, majhno velikost por ter večjo prožnost in mehansko trdnost v primerjavi z istimi materiali večjih dimenzij. Prav zaradi tega nanovlakna izražajo velik potencial za uporabo na področjih biomedicine, farmacije, tkivnega inženirstva pa vse do energetike, filtracije in zaščitnih oblačil. Sodobna, vsestranska, enostopenjska in ekonomična metoda za izdelavo nanovlaken je elektrostatsko sukanje.

Cilj diplomske naloge je bil izdelati nanovlakna iz polietilenoksida (PEO). Izbor polimera je temeljil na tem, da je PEO netoksičen, biokompatibilen, hidrofilen in varen, saj se kot pomožna snov široko uporablja v farmaciji, kozmetiki in prehrambeni industriji. Hkrati je tudi eden izmed prvih polimerov, iz katerih so bila narejena nanovlakna s postopkom elektrostatskega sukanja. Kot topilo smo uporabljali prečiščeno vodo. Polimeru PEO smo v nekaterih primerih zaradi večje fizikalne stabilnosti dodali tudi hitosan. Poleg same izdelave nanovlaken smo se posvetili intenzivnemu proučevanju vpliva izbranih spremenljivk elektrostatskega sukanja na morfologijo nanovlaken ter raziskali metode stabilizacije nanovlaken za potrebe obstojnosti v fizioloških pogojih.

Ugotovili smo, da so za pripravo nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja primerna 4 %, 5 % in 6 % raztopina PEO z molekulsko maso 400.000 g/mol (400k) ter 4 % in 5 % raztopina PEO molekulske mase 900.000 g/mol (900k), pri čemer smo v večini primerov kot rezultat dobili vlakna z vozli. Le v primeru 5 % in 6 % raztopine PEO 400k pri napetostih 20 kV in 25 kV ter 4 % raztopine PEO 900k pri napetosti 15 kV so nastala gladka nanovlakna. Premer nanovlaken je bil v območju od 30 nm do 330 nm, ugotovili pa smo, da se z višanjem uporabljene električne napetosti ter z večanjem deleža hitosana premer vlaken manjša, medtem ko višja koncentracija ter molekulska masa polimera povečata premer vlaken. Dodatno smo znatno povečanje premera v vseh primerih opazili pri prehodu vlaken z vozlasto morfologijo v gladka vlakna.

Sama PEO nanovlakna se v vodnem mediju hitro raztopijo, zato smo jih poskusili stabilizirati s fizikalnimi metodami stabilizacije, kot sta termična stabilizacija in namakanje v netopilih. Fizikalne metode stabilizacije, ki smo jih uporabili v primeru PEO nanovlaken, niso bile uspešne, zato smo PEO kombinirali s hitosanom, da bi v nanovlakna vpeljali stranske amino skupine, ki bi omogočale kemijsko stabilizacijo z glutaraldehidom. Rezultati so pokazali, da



prečno premrežena nanovlakna ohranijo vlaknasto strukturo ter so v simuliranem fiziološkem okolju, ki smo ga ponazorili z uporabo fosfatnega pufra (pH 7,4), obstojna več kot 20 dni. Poskus spremljanja hidratacije je pokazal, da vlakna zelo hitro hidratirajo, nato pa prevlada proces erozije, ki poteka počasi in enakomerno, pri čemer je enak trend opazen ne glede na delež hitosana v PEO nanovlaknih.

Zaključimo lahko, da morajo biti za popolnoma gladka nanovlakna vsi procesni parametri, lastnosti polimerne raztopine ter vplivi okolja v optimalnem razmerju, pri čemer je vsak posamezen parameter še vedno potrebno eksperimentalno določiti. Kljub temu pa PEO nanovlakna, zlasti z dodatkom hitosana, izdelana s postopkom elektrostatskega sukanja, nedvomno predstavljajo napreden pristop na področju razvoja novih materialov za uporabo v biomedicini.

## ABSTRACT

Nanofibers are solid fibers prepared from different polymers, which exhibit improved chemical and physical properties due to their nanometer scale, among them enormous surface area per unit volume or mass, small pore size as well as greater flexibility and mechanical strength compared to the same material of larger dimensions. Therefore, nanofibers show great potential in the fields of biomedicine, pharmacy, tissue engineering, energetics, filtration and protective clothing. A modern, versatile, one-step and economical method for producing nanofibers is electrospinning.

The aim of present work was to prepare nanofibers from poly-(ethylene oxide) (PEO). PEO was chosen as polymer, since it is nontoxic, hydrophilic, biocompatible plus safe and thus also widely used as an excipient in pharmaceutical, cosmetic and food industry. Moreover, PEO is also one of the first polymers used to produce nanofibers by electrospinning. Purified water was used as a solvent. For improved physical stability of PEO nanofibers, in some cases we added chitosan to the polymer solutions. Beside formation of nanofibers an extensive research was made on how selected parameters of electrospinning affect the morphology of nanofibers and additionally, methods for stabilization of nanofibers in physiological conditions were studied.

Our results showed that solutions suitable for preparation of PEO nanofibers by electrospinning are 4 %, 5 % and 6 % solutions of PEO with molecular weight 400.000 g/mol and 4 % and 5 % solutions of PEO with the molecular weight 900.000 g/mol. Nanofibers produced in most cases have bead-on-string morphology, whereas smooth nanofibers are formed only from 5 % and 6 % solutions of PEO 400k using 20 kV and 25 kV as well as from 4 % solution of PEO 900k at 15 kV. The fiber diameter ranged from 30 nm to 330 nm. Furthermore, we ascertained that the fiber diameter decreases with increasing voltage and amount of chitosan added. However, fiber diameter increases with increasing concentration and molecular weight of the polymer. Moreover, a significant increase in fiber diameter was observed when the morphology of the nanofibers changed from beaded to fibrous.

Nanofibers produced from pure PEO are dissolved rapidly in water. Therefore, different methods for physical stabilisation of nanofibers, such as thermal stabilisation and stabilisation using non-solvents were used. Unfortunately, results showed that they were unsuccessful. Therefore, PEO was combined with chitosan in order to integrate amino groups needed for the chemical stabilisation with glutaraldehyde into nanofibers. We proved that

cross-linked nanofibers maintain their fibrous structure, whereas stability in physiological environment is prolonged to at least 20 days. The study of hydration showed rapid hydration of the nanofibers at the beginning followed by slow and gradual erosion. The same trend was observed regardless the amount of chitosan used.

To conclude, for the formation of smooth nanofibers all process parameters, solution properties and ambience factors have to be in an optimal balance, whereat every variable still needs to be determined experimentally. Nevertheless, electrospun PEO nanofibers, especially those combined with chitosan, represent a modern approach in development of novel materials in the field of biomedicine.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

AFM – mikroskop na atomsko silo

CH – hitosan

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija

GA – glutaraldehid

GIT – gastrointestinalni trakt

HEPA – visoko učinkovit zračni filter

LCD – zasloni na tekoče kristale

PBS – fosfatni pufer

PEG – polietilenglikol

PEO – polietilenoksid

PEO 400k – polietilenoksid molekulske mase 400.000 g/mol

PEO 900k – polietilenoksid molekulske mase 900.000 g/mol

POE – polioksietilen

PVA – polivinil alkohol

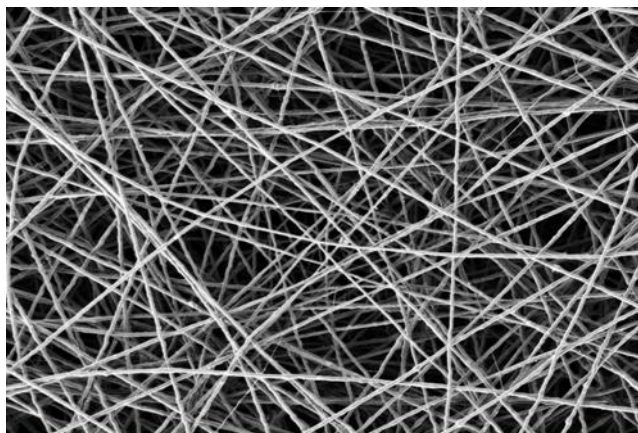
SEM – vrstični elektronski mikroskop

TEM – presewni elektronski mikroskop

## 1. UVOD

### 1. 1. Nanovlakna

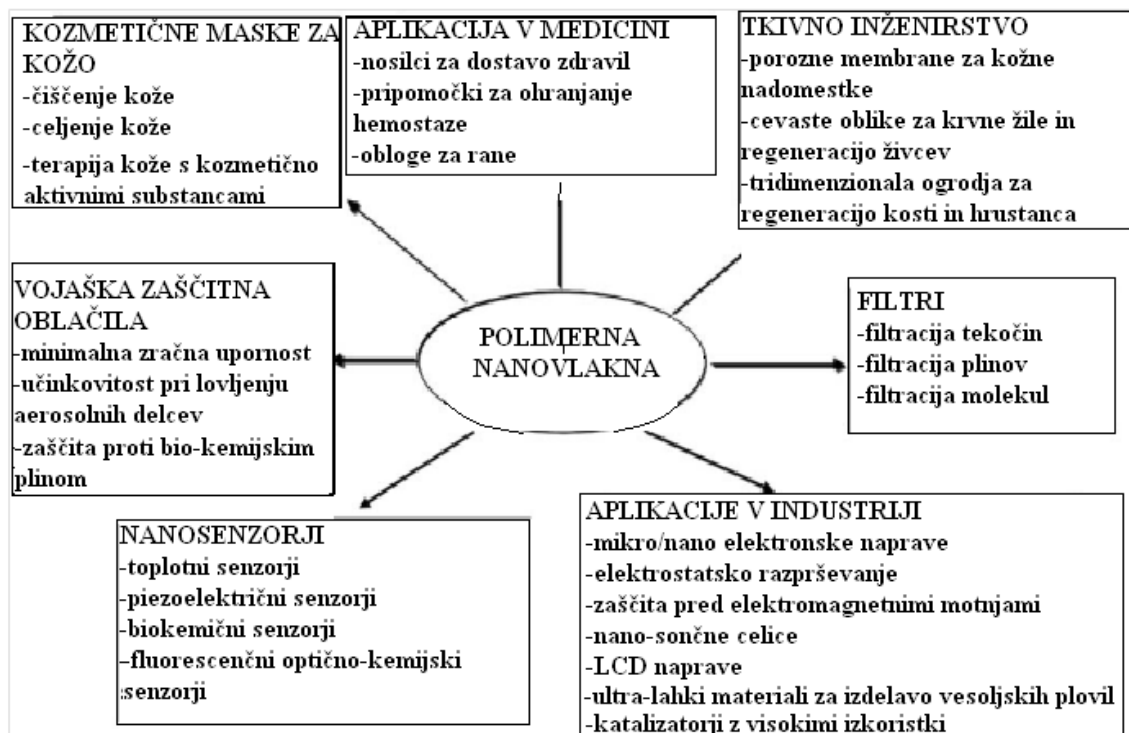
Izraz nanovlakna označuje tanka trdna vlakna, ki imajo premer na nanometrskem nivoju, medtem ko je njihova dolžina v teoriji neomejena. Nanovlakna imajo zaradi svoje strukture izredno veliko razmerje med površino in volumenom, majhno velikost por, veliko fleksibilnost in večjo mehansko trdnost v primerjavi s katerokoli obliko enakega materiala (1, 2). Najpogostejše so izdelana iz različnih polimerov, pripravimo pa jih lahko z vrsto metod, pri čemer z modifikacijami procesa izdelave in materialov formuliramo nanovlakna želene morfologije. Tako lahko dobimo klasična okrogla nanovlakna različnih premerov in stopnje poroznosti, sploščena ali votla nanovlakna, izdelamo pa lahko tudi nanovlakna z različno sestavo sredice in ovojnice. Primer nanovlaken iz polietilenoksida je prikazan na Sliki 1 (1).



**Slika 1:** Nanovlakna iz polietilenoksida (PEO) posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), povečava 10.000 X.

#### 1. 1. 1. Uporaba nanovlaken

Nanovlakna zaradi zmanjšanja velikosti na nanometrski nivo izkazujejo kar nekaj osupljivih kemijskih, fizikalnih in bioloških lastnosti, zaradi česar postajajo predmet zanimanja na številnih področjih znanosti. Ker so sposobna s svojo specifično vlaknasto strukturo posnemati tudi fibrilarne strukturne elemente biološkega tkiva, imajo nanovlakna še posebej izrazit potencial na področju biomedicine, kjer jih raziskujejo kot dostavne sisteme zdravilnih učinkovin, sodobne obloge za celjenje ran ter tkivne nadomestke (1, 2). Široke možnosti uporabe nazorno prikazuje Slika 2, nekatere izmed njih pa bomo še dodatno predstavili v nadaljevanju.



Slika 2: Področja uporabe polimernih nanovlaken (2).

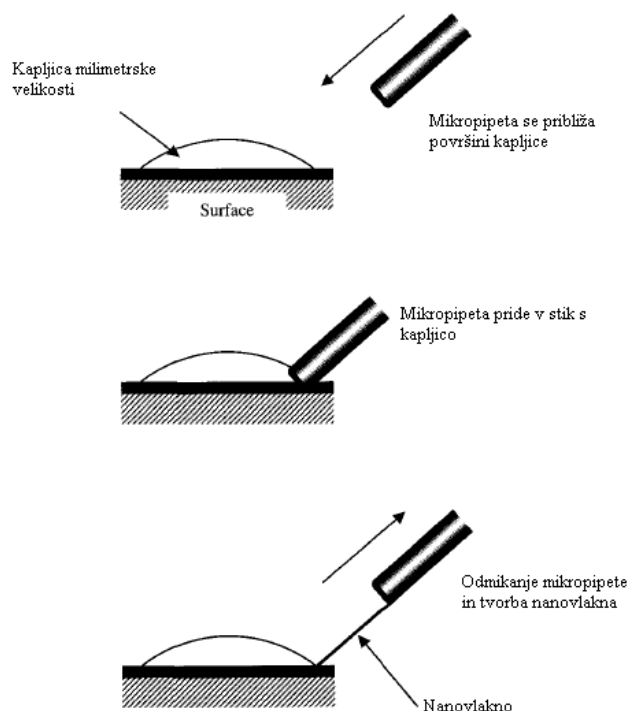
- **Afinitetne membrane:** imajo funkcijo ločevanja specifičnih tarčnih biomolekul s pomočjo ligandov, ki so kemijsko pritrjeni na površino nanovlaknaste membrane. V primerjavi s klasičnimi kolonami za filtracijo membrane iz nanovlaken omogočajo višjo stopnjo separacije zaradi velike površine nanovlaken (1).
- **Dostava zdravil:** na področju dostave zdravil imajo nanovlakna funkcijo nosilca. Primarno mesto aplikacije nanovlaken z vgrajeno zdravilno učinkovino je koža, (najpogostejše rane) za namene lokalne dostave, lahko pa jih vgradimo tudi v ustrezno farmacevtsko obliko za dostavo učinkovine prek GIT. Prednost tovrstnih dostavnih sistemov je doseg želenega profila sproščanja zaradi porozne strukture in velike površine nanovlaken, ki ga še dodatno lahko nadzorujemo s spreminjanjem premera ali usmerjenosti nanovlaken (1).
- **Tkivni nadomestki:** nanovlakna lahko služijo kot nadomestki v tkivnem inženirstvu, saj podrobnejše poznavanje strukture tkiv razkrije, da je večina človeških organov in tkiv prav hierarhično urejena vlaknasta struktura. Nanovlakna tako posnemajo fibrilarne elemente naravnega zunajceličnega matriksa, omogočajo pritrditev in razraščanje celic, s tem pa hitrejšo in popolnejšo rekonstrukcijo okvarjenih ali poškodovanih tkiv (1).

- **Obloge za rane:** nanovlaknaste membrane izkazujejo velik potencial tudi kot sodobne obloge za celjenje ran, saj so sposobne rani zagotavljati vlago, kar izrazito pospeši celjenje, hkrati pa imajo še veliko prepustnost za pline ter rano zaščitijo pred infekcijo. Pri celjenju se tako poveča stopnja epitelizacije, dermis pa se v nanovlaknih dobro organizira in predstavlja oporo za nadaljnje celjenje (4).
- **Filtri :** nanovlakna so prav tako lahko uporabna za čiščenje zraka, ki vsebuje prašne delce, vlago ali bakterije (1), s pravilno izbiro materiala pa lahko dosežemo primerljivo sposobnost filtracije kot pri klasičnih HEPA filtrih (5).
- **Kemična in biološka zaščitna oblačila:** na področju zaščitnih oblačil so nanovlakna pritegnila pozornost v prvi vrsti zaradi velike razpoložljive specifične površine, ki omogoča učinkovito nevtralizacijo škodljivih plinov. Ta je lahko namreč do 5-krat večja, kot pri klasičnih materialih in lahko doseže celo do  $20 \text{ m}^2/\text{g}$  (6). Tovrstna oblačila so tudi izjemno lahka ter prepuščajo vlago in zrak, hkrati pa lahko zaščitijo uporabnika pred strupenimi plini in biološkim orožjem (1).
- **Baterije in kondenzatorji:** nanovlakna so prisotna tudi na področju energetike, saj omogočajo izboljšanje lastnosti polimernih baterij in kondenzatorjev. Zaradi porozne strukture so membrane iz nanovlaken sposobne držati večje količine elektrolita, ogromna površina nanovlaken pa je odgovorna za odlično ionsko prevodnost (1).
- **Senzorji:** nanovlakna raziskujejo tudi kot senzorje za pline, kemijske senzorje, optične senzorje ter biosenzorje, pri čemer je vloga senzorjev pretvorba fizikalnega ali kemičnega odziva v električni signal. Zaradi velikega razmerja med površino in volumenom so senzorji iz nanovlaken izredno občutljivi in hitro odzivni (1).

### 1. 1. 2. Metode za izdelavo nanovlaken

Za izdelavo nanovlaken je na voljo več procesnih tehnik, in sicer:

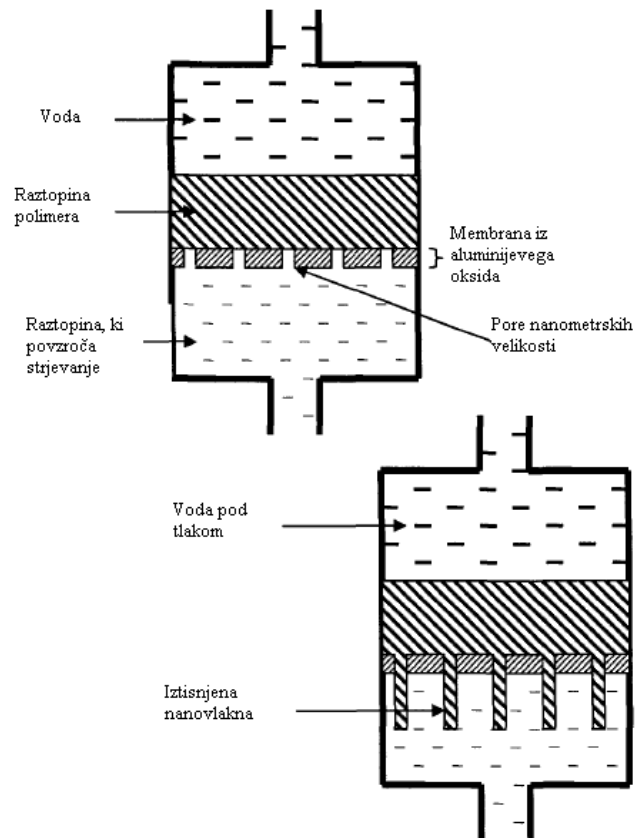
- Metoda z vlekom (ang. »drawing«), ki je prikazana na Sliki 3, je proces, s katerim lahko posamično naredimo zelo dolgo vlakno, vendar pa s to metodo lahko izdelujemo nanovlakna le iz viskoelastičnih in kohezivnih materialov, ki prenesejo močne obremenitve in deformacije.



**Slika 3:** Pridobivanje nanovlakna s postopkom vleka (1).

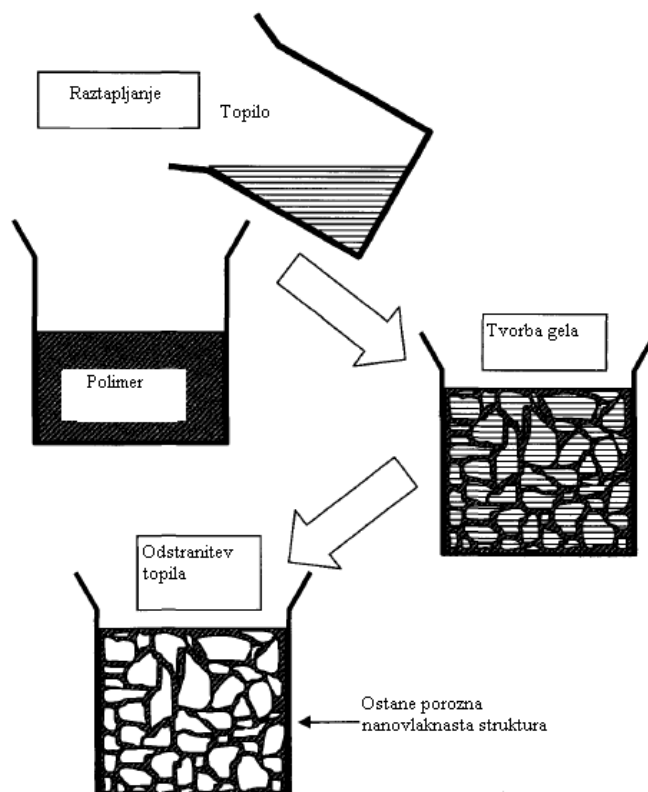
- Uporaba predlog (ang. »*template synthesis*«) je proces, pri katerem uporabljamo vnaprej narejeno nanoporozno membrano kot predlogo za izdelavo nanovlaken ali votlih nanocevk, pri čemer z ustrezno izbiro membrane enostavno nadziramo premer vlaken, kot je razvidno iz Slike 4. Čeprav je prednost tega procesa možnost priprave nanovlaken iz surovih materialov, kot so električno prevodni materiali, kovine in polprevodniki, pa po drugi strani s to metodo ni mogoče kontinuirano izdelovati posamičnih vlaken.





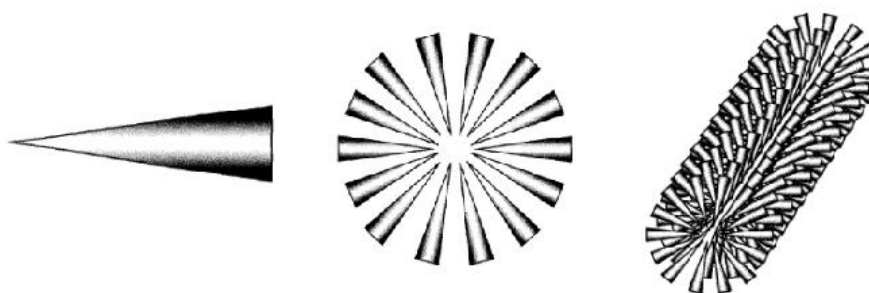
**Slika 4:** Pridobivanje nanovlaken z uporabo nanoporozne membrane (1).

- Fazna separacija (ang. »*phase separation*«) je večstopenjski proces, pri katerem izdelamo nanovlakna skozi faze raztapljanja, geliranja, ekstrakcije z uporabo topila, zmrzovanja in sušenja, kot je prikazano na Sliki 5. Vsi ti koraki vodijo do nastanka nanoporozne pene, postopek pa traja relativno dolgo.



**Slika 5:** Pridobivanje nanovlaken s postopkom fazne separacije (1).

- Spontana tvorba (ang. »self-assembly«) nanovlaken je proces, pri katerem se uporabljene komponente spontano organizirajo v želene vzorce, primeri katerih so prikazani na Sliki 6. Pridobimo lahko manjša vlakna, tudi ta postopek pa je časovno potraten (1, 2).



**Slika 6:** Primer spontane tvorbe nanovlaken iz monomerov (na sliki levo), ki so običajno majhne molekule (1).

- Elektrostatsko sukanje (ang. »*electrospinning*«) je sodobna in danes najpogostejše uporabljena metoda za izdelavo nanovlaken, katere osnovni princip je uporaba elektrostatske sile kot gonilne sile za tvorbo vlaken (1). Ker smo s to metodo izdelali nanovlakna v pričujočem diplomskem delu, je le-ta podrobneje opisana v nadaljevanju.

### **1. 1. 3. Vrednotenje nanovlaken**

Vrednotenje nanovlaken obsega predvsem določanje njihovih morfoloških lastnosti, kot so premer vlaken in distribucija velikosti, velikost por, orientacija vlaken. To najpogostejše opravimo z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), transmissijskim elektronskim mikroskopom (TEM) in z mikroskopom na atomsko silo (AFM). AFM lahko dodatno uporabimo še za karakterizacijo hrapavosti površine (1, 2). Molekularno strukturo nanovlaken okarakteriziramo z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), rentgensko praškovno difrakcijo, infrardečo spektroskopijo in nuklearno magnetno resonanco (2). Če sta se za izdelavo nanovlaken različna polimera povezala med seboj, lahko poleg strukture obeh materialov z uporabo IR analize zasledimo tudi intermolekularne interakcije (2). Pri mehanski karakterizaciji je potrebno določiti tako lastnosti skupka nanovlaken, kot tudi enega samega vlakna. V ta namen lahko uporabimo standardne tehnike natezne trdnosti, medtem ko se za mehansko karakterizacijo enega samega vlakna ponovno poslužujemo AFM (1, 2).

## **1. 2. Elektrostatsko sukanje**

Elektrostatsko sukanje je sodobna, vsestransko uporabna, enostopenjska ter finančno ugodna metoda za izdelavo nanovlaken. Koncept elektrostatskega sukanja je sicer znan že več kot sto let, vendar pa se je zanimanje zanj izrazito povečalo v zadnjem desetletju, zlasti zaradi silovitega razvoja nanotehnologije (7).

### **1. 2. 1. Razvoj elektrostatskega sukanja**

Osnovni princip elektrostatskega sukanja je postavil Taylor leta 1969, ko je proučeval obnašanje kapljice polimerne raztopine na konici igle, na katero je priključil visoko električno napetost. Ugotovil je, da se kapljica polimerne raztopine razvije v stožec (danes imenovan *Taylorjev stožec*), ko se sile električne napetosti izenačijo s silami površinske napetosti polimerne raztopine. Nadaljnje višanje napetosti pa nato privede do tvorbe električno nabitega curka iz vrha Taylorjevega stožca, ki je bistven za nastanek nanovlaken (8). Le nekaj let pozneje se je pričelo zanimanje za globlje razumevanje povezav med posameznimi procesnimi spremenljivkami ter lastnostmi raztopine in morfološkimi

lastnostmi nanovlaken. Tako je Baumgarten proučeval vpliv viskoznosti raztopine na premer nanovlaken in ugotovil neposredno odvisnost med spremenljivkama, pri čemer se premer nanovlaken večja z naraščanjem viskoznosti raztopine. Ugotovil je tudi, da se premer nanovlaken ne manjša enakomerno z naraščajočo močjo električnega polja, ampak se manjša samo na začetku, dokler ne doseže nekega minimuma, potem pa se z nadaljnjim večanjem moči električnega polja začne večati tudi premer (8, 24). Gupta je proučeval vpliv molekulske mase polimera na tvorbo nanovlaken in ugotovil, da se z večanjem molekulske mase manjša število vozlov in kapljic na nanovlaknih (7, 35). Meechaisue pa je ugotovil, da se ob prvi stopnji povečanja električne napetosti najprej zmanjša pojavnost vozlov, z nadaljnjim večanjem pa se nastala nanovlakna debelijo (8, 36).

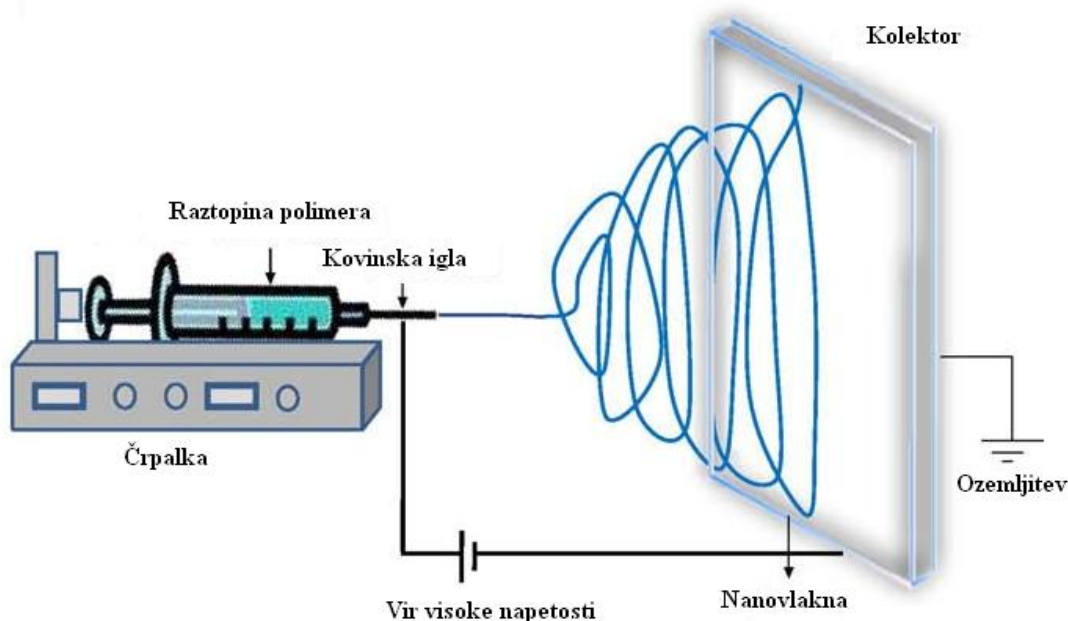
Dodatno so raziskave vključevale še proučevanje tvorbe nanovlaken iz talin polimerov. Tako so Larrondo in sodelavci uspešno izdelali nanovlakna iz talin polietilena in polipropilena ter opazili, da imajo takšna nanovlakna relativno večji premer kot nanovlakna izdelana iz raztopine (9, 10). V tem obdobju so se začele tudi raziskave o možnosti uporabe nanovlaken na področju tkivnega inženirstva. Ena izmed prvih objavljenih študij na to temo je iz leta 1978, v njej pa so Annis in sodelavci raziskovali potencialne možnosti uporabe nanovlaken iz poliuretana za vaskularno protezo (11).

### **1. 2. 2. Prednosti elektrostatskega sukanja**

Za razliko od drugih metod izdelave nanovlaken elektrostatsko sukanje omogoča kontinuirano izdelavo nanovlaken, poleg tega pa je možna uporaba te metode tudi v industrijskem merilu. Za izdelavo nanovlaken lahko uporabljamo tako naravne kot sintezne polimere, pri njihovi izbiri pa teoretično nismo omejeni. Pripraviti moramo »le« polimerno raztopino ustrezne koncentracije v ustreznem topilu ali njegovo talino. Velja omeniti, da se v današnjih raziskavah večinoma uporabljajo raztopine polimerov zaradi lažjih pogojev dela (ni potrebna povišana temperatura ter vakuum) in možnosti enostavnega spreminjanja lastnosti raztopine, ki vodijo v nanovlakna želene morfologije (7, 8).

### **1. 2. 3. Mehanizem elektrostatskega sukanja**

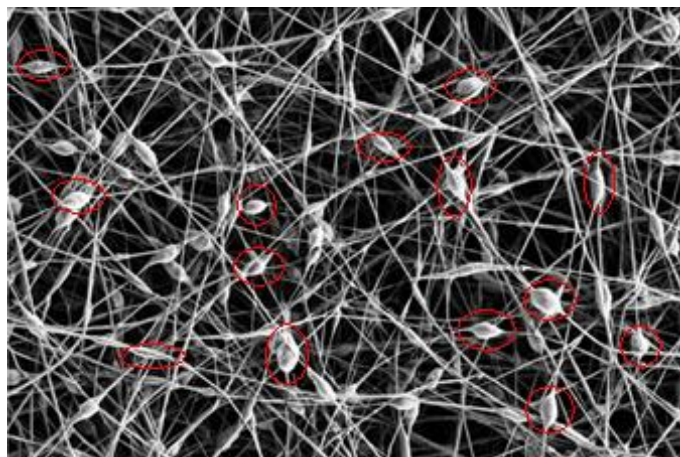
Aparatura za izdelavo nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja je predstavljena na Sliki 7 in je v osnovi sestavljena iz treh komponent: generatorja, ki omogoča visoko napetost, kovinske igle majhnega premera (0,05-1,8 mm), skozi katero injiciramo raztopino/talino polimera ter zbirala, kjer zberemo narejena nanovlakna.



**Slika 7:** Shema aparature za elektrostatsko sukanje (7).

Polimerna raztopina se torej nahaja v brizgi, iz katere jo s pomočjo črpalke, gravitacijske sile ali potisnega plina potiskamo skozi kovinsko iglo majhnega premera, na katero je pripet izvor visoke napetosti. Na konici igle se najprej tvori viseča kapljica, ob priključitvi na električno napetost pa v raztopino uvajamo električni naboj, ki se porazdeli po površini kapljice. Z večanjem napetosti se površina kapljice zaradi naraščajočih odbojnih sil med istovrstnimi naboji v raztopini ter privlačnih sil med nasprotno nabitim zbiralom in raztopino izoblikuje v Taylorjev stožec, nato pa se tvori nabit curek, ki pospešeno potuje proti zbiralu. Na poti do zbiralca je curek podvržen nestabilnostim zaradi delovanja različnih sil, in sicer: elektrostatske odbojne sile med enako nabitimi delci, elektrostatske sile, ki vleče curek k zbiralu, viskoelastične sile, sile površinske napetosti, ki preprečuje raztegnitev curka, gravitacijske sile ter vlečne sile zaradi trenja med curkom in okoliškim zrakom.

Posledica delovanja vseh teh sil je tanjšanje in raztegovanje curka in njegovo tanjšanje do nanometrskih velikosti ter hkratno izhlapevanje topila, zato se na zbiralu zberejo trdna nanovlakna (7, 8). Poenostavljeno lahko rečemo, da gre pri elektrostatskem sukanju za raztegovanje polimernih verig. Kadar pa zaradi neoptimalnih pogojev ne pride do popolne iztegnitve polimera, dobimo na nanovlaknih vozle (ang. *“beads”*), ki so prikazani na Sliki 8.



**Slika 8:** SEM slika PEO nanovlaken z vozli (označeni z rdečo barvo).

Velja poudariti, da je opisani mehanizem le ena od možnih razlag molekularnega dogajanja med tvorbo nanovlaken, saj je razumevanje celotnega dogajanja še vedno zelo omejeno.

### **1. 3. Spremenljivke**

Na sposobnost tvorbe in morfologijo izdelanih nanovlaken močno vplivajo tako procesni parametri, kot lastnosti polimerne raztopine, določen vpliv pa izkazujejo tudi parametri okolja.

#### **1. 3. 1. Lastnosti polimerne raztopine**

Lastnosti polimerne raztopine, iz katere želimo nanovlakna pripraviti, pomembno določajo sposobnost tvorbe curka med procesom elektrostatskega sukanja in morfologijo izdelanih nanovlaken. Med najpomembnejše spadajo molekulska masa polimera, koncentracija, viskoznost, površinska napetost ter prevodnost, vpliv pa ima tudi hlapnost topila.

- *Molekulska masa polimera*

Molekulska masa polimera ima vpliv na reološke in električne lastnosti raztopine, saj določa viskoznost, površinsko napetost in kadar gre za polielektrolit, tudi prevodnost, zato je zelo vpliven parameter pri izdelavi nanovlaken. Večinoma se za elektrostatsko sukanje uporabljajo polimeri visokih molekulskih mas, saj že nizke koncentracije le-teh omogočajo ustrezno prepletanje polimernih verig, ki je potrebno za kontinuiran, stabilen curek in s tem uspešno tvorbo nanovlaken. Pri polimerih nižjih molekulskih mas moramo ponavadi uporabiti višje koncentracije, večja pa je možnost nastanka vozlov. Velja poudariti, da visoke molekulske mase niso vedno bistvene za uspešnost elektrostatskega sukanja, saj lahko v

nekaterih primerih prepletanje polimernih verig nadomestijo intermolekularne interakcije, ki se pojavljajo pri določenih vrstah polimerov (1, 7).

- *Koncentracija polimerne raztopine*

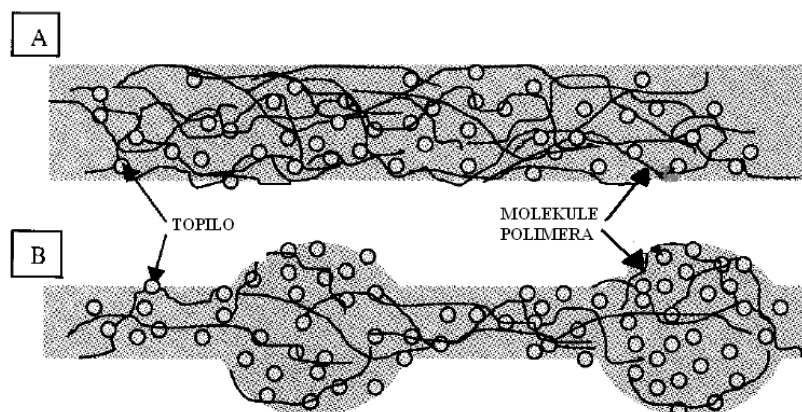
Za tvorbo vlaken pri elektrostatskem sukanju je potrebna določena minimalna koncentracija polimera, ki zagotavlja ustrezno viskoznost, prepletanje verig in površinsko napetost. Če je koncentracija polimera prenizka, se namreč curek zaradi delovanja površinske napetosti razprši v kapljice, še preden doseže zbiralo. V primeru previsoke koncentracije pa se viskoznost tako poveča, da je težko nadzirati pretok skozi kovinsko iglo, poleg tega pa je treba uporabiti izjemno visoko električno napetost, zaradi česar delo ni več varno. Za vsak polimer tako obstaja optimalno območje koncentracij, pri katerih je elektrostatsko sukanje mogoče, znotraj tega območja pa so ugotovili, da se premer nanovlaken veča z naraščanjem koncentracije (1, 7, 8).

- *Viskoznost*

Kot že omenjeno, imajo na viskoznost vpliv številni parametri, predvsem koncentracija in molekulska masa polimera ter temperatura. Za različne polimere je optimalna različna viskoznost, ki mora biti dovolj visoka, da omogoča nastanek stabilnega curka, vendar pa ne sme biti previsoka, saj je v takšnem primeru proces onemogočen (1, 7).

- *Površinska napetost*

Površinska napetost je v veliki meri odvisna od topila in predstavlja težnjo zmanjšanja površine na enoto mase. Visoka vrednost površinske napetosti tako povzroči razpad curka v kapljice, saj je to termodinamsko ugodneje, odgovorna pa je tudi za tvorbo vozlov, še zlasti v primeru, ko polimerna raztopina ni dovolj viskozna, kar prikazuje Slika 9. Pri elektrostatskem sukanju morajo elektrostatske sile premagati silo površinske napetosti, da se lahko tvori curek, zato površinska napetost določa vrednost minimalne uporabljene električne napetosti. Ker se pri manjših vrednostih površinske napetosti lahko tvorba nanovlaken začne pri nižji električni napetosti, v raziskavah dodajajo v polimerne raztopine površinsko aktivne snovi ali uporabljajo topila z nizko površinsko napetostjo (1, 7, 12).



**Slika 9:** Nastanek vozlov: A- pri višji viskoznosti so molekule topila razporejene med prepletenimi molekulami polimera. B- pri nižji viskoznosti pa se molekule topila začnejo združevati zaradi vpliva površinske napetosti (1).

- *Prevodnost*

Prevodnost polimerne raztopine je odvisna od polimera, topila in razpoložljivih elektrolitov. Nabiti ioni v raztopini določajo odbojne sile v curku med procesom elektrostatskega sukanja, zato ima prevodnost pomemben vpliv na premer nanovlaken. Raztopine z večjo prevodnostjo nosijo večjo gostoto naboja, zato so tudi podvržene višjim elektrostatskim silam v električnem polju, pri čemer so ugotovili, da je premer vlaken obratno sorazmeren kvadratnemu korenu prevodnosti. Na premer nanovlaken lahko torej vplivamo z dodatkom elektrolitov, a velja poudariti, da le do določene meje. Za raztopine z zelo visoko prevodnostjo so namreč potrdili, da so v električnem polju izjemno nestabilne, kar posledično vodi do nanovlaken s široko porazdelitvijo premerov (7, 8). Po drugi strani pa dodatek elektrolitov zmanjša pojav vozlov in omogoča elektrostatsko sukanje pri nižjih napetostih (1).

- *Lastnosti topila*

Izbira topila močno vpliva na že prej omenjene lastnosti raztopine, prav tako pa ima odločilen vpliv na sposobnost polimerne raztopine, da se raztegne v tanek curek, iz katerega se tvorijo nanovlakna. Topilo vpliva tudi na poroznost vlaken. Primerno topilo naj bi imelo naslednje lastnosti: dobra hlapnost, primeren parni tlak in vrelišče, sposobno mora biti ohranjati konstantne lastnosti raztopine. Glavna značilnost topila pa je, da mora biti polimer v njem popolnoma topen. Pri potovanju curka od igle proti zbiralu prihaja do fazne ločitve zaradi izhlapevanja topila, nanovlakna se sušijo in postajajo trdna. Na ta proces ima velik vpliv parni tlak topila in s tem hitrost izhlapevanja, ki mora biti zadostna, da se vlakna posušijo,



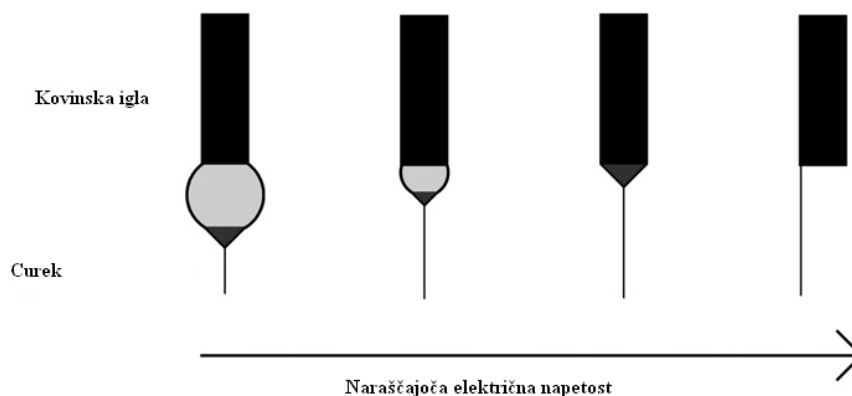
zato je smiselna uporaba hlapnih topil. Bolj hlapna topila pa vodijo tudi do večje poroznosti nanovlaken (7, 8).

### **1. 3. 2. Procesni parametri**

Poleg lastnosti raztopine igrajo ključno vlogo pri tvorbi nanovlaken procesni parametri. Najpomembnejši so uporabljena električna napetost, pretok polimerne raztopine, razdalja med iglo in zbiralom ter tip zbiralca. Njihovi vplivi na morfologijo, premer in usmerjenost nanovlaken so opisani v nadaljevanju:

- *Uporabljena električna napetost*

Pri procesu elektrostatskega sukanja je uporabljena električna napetost za tvorbo curka ključnega pomena, s spreminjanjem le-te pa vplivamo tako na sposobnost tvorbe nanovlaken, kot tudi na njihovo morfologijo. Visoka napetost inducira v raztopini naboj, ki je skupaj z zunanjim električnim poljem potreben, da se proces elektrostatskega sukanja lahko začne. To pa se zgodi, ko elektrostatska sila v raztopini preseže sile površinske napetosti. Napetost, ki je potrebna za stabilen curek, je odvisna od vrste polimera oziroma njegove raztopine ter tudi od pretoka. Odbojne sile v curku so potem vodilna sila za raztegovanje viskoelastične raztopine in s tem tanjšanje ter daljšanje curka. Višja, kot je uporabljena napetost, hitreje curek pospešuje proti zbiralu, posledično se s konice igle odstranjuje večji volumen raztopine. Kot je razvidno iz Slike 10, to lahko povzroči, da Taylorjev stožec postaja manjši in manj stabilen ter se z večanjem napetosti celo premakne v notranjost kovinske igle, curek pa se tvori neposredno iz igle (15, 16, 17). Omenjeni pojav je opazila raziskovalna skupina pod vodstvom Deitzela v študiji, kjer so proučevali obnašanje vodne raztopine PEO ter ugotovili, da se z višanjem napetosti nad točko, kjer se curek tvori na konici igle, večja število nepravilnosti na vlaknih, predvsem v obliki vozlov (17).



**Slika 10:** Vpliv naraščajoče električne napetosti na obliko in velikost Taylorjevega stožca (8).

Uporabljena napetost in iz nje izhajajoče električno polje imata torej vpliv na raztezanje in pospeševanje curka ter posledično tudi na morfologijo dobljenih nanovlaken. V večini primerov vodi višja napetost do večjega raztezanja polimernih verig zaradi večjih odbojnih sil znotraj curka in močnejšega električnega polja, kar pa ima za posledico zmanjšanje premera vlaken, pospešeno pa je tudi izhlapevanje topila (18,19). V primeru manj viskozne raztopine višanje napetosti vodi do tvorbe sekundarnih curkov, kar posledično prav tako vodi do zmanjšanja premera vlaken (20).

Raziskave so še pokazale, da se s spreminjanjem napetosti spreminja tudi oblika vozlov. Ti so pri nižjih napetostih okrogle oblike, ob višanju napetosti pa se podaljšajo, kar izrazito nakazuje na večje raztezanje polimernih verig (16). Na tem mestu velja omeniti, da višanje napetosti vodi v izboljšano morfologijo samo do neke mere, medtem ko še dodatno višanje vodi v obraten pojav (17).

Dodatno se vpliv napetosti kaže tudi v stopnji kristaliničnosti polimernih nanovlaken, saj električno polje povzroči urejanje molekul polimera med procesom elektrostatskega sukanja. Tako se kristaliničnost viša do določene napetosti, nato pa se zaradi skrajšanega potovanja curka molekule nimajo več časa urediti, kar posledično vodi v zmanjšanje kristaliničnosti (21).

Pri elektrostatskem sukanju ponavadi uporabljamo enosmerno električno napetost, možna pa je tudi uporaba izmenične električne napetosti. Za raztegovanje in upogibanje curka so odgovorni naboji v raztopini, ki so v primeru enosmerne napetosti enaki, zato je tu prisotnih več odbojnih sil znotraj samega curka. V primeru izmenične napetosti pa so v curku prisotni tako pozitivni kot negativni naboji, zato so odbojne sile znotraj curka manjše, kar pomeni manj raztezanja in upogibanja le-tega. Posledično dobimo z uporabo izmenične napetosti nanovlakna večjega premera kot pri enosmerni napetosti. Prednost uporabe izmenične

napetosti pa je v dejstvu, da pride do manjše akumulacije nabojev iste polaritete na vlaknih, ki se nabirajo na zbiralu, zaradi česar je možno na zbiralu dobiti debelejšo plast nanovlaken (230).

Univerzalnega pravila za določanje optimalne napetosti za posamezen sistem polimer/topilo zaenkrat še ni, zato je napetost še vedno potrebno eksperimentalno preveriti. Za vsako polimerno raztopino pa velja, da obstaja neko optimalno območje električne napetosti, pri kateri je elektrostatsko sukanje uspešno in vodi do nastanka gladkih nanovlaken, pri čemer pa lahko previsoka ali prenizka napetost povzroči nastanek vozlov ali celo onemogoči tvorbo curka.

- *Pretok polimerne raztopine*

Pretok polimerne raztopine določa količino polimerne raztopine, ki je na voljo za elektrostatsko sukanje, pri določeni električni napetosti pa je potreben ustrezen pretok, ki zagotavlja stabilen Taylorjev stožec na konici kovinske igle. Z večanjem pretoka se večja tudi premer vlaken ali vozlov, saj je na voljo več polimerne raztopine, kar pa lahko vodi tudi do nezadostnega sušenja vlaken in povzroči zlepljanje le-teh na zbiralu. Prav zaradi tega so zaželeni manjši pretoki, saj ima tako topilo več časa za izhlapevanje, kar vodi do gladkih in suhih nanovlaken (1, 7).

- *Premmer kovinske igle*

Notranji premer uporabljene kovinske igle ima manjši, a vseeno določen vpliv na proces elektrostatskega sukanja. Tako manjši notranji premer igle zmanjša možnost zamašitve igle, kar pojasnjujejo z dejstvom, da je pri manjših premerih manj polimerne raztopine izpostavljene zunanjemu okolju. Zmanjša se pojavnost vozlov na vlaknih, pa tudi premer samih vlaken. Pri manjšem premeru igle se namreč poveča površinska napetost na kapljici, saj je le-ta manjša, zato je posledično potrebna večja sila za tvorbo curka, pri isti napetosti pa ima curek manjši pospešek. To pa tudi pomeni več časa za raztegovanje in podaljševanje polimerne raztopine, kar vodi do nanovlaken manjšega premera. Seveda pa premer igle ne sme biti premajhen, saj lahko to onemogoči prehajanje polimerne raztopine skozi samo iglo (1, 21).

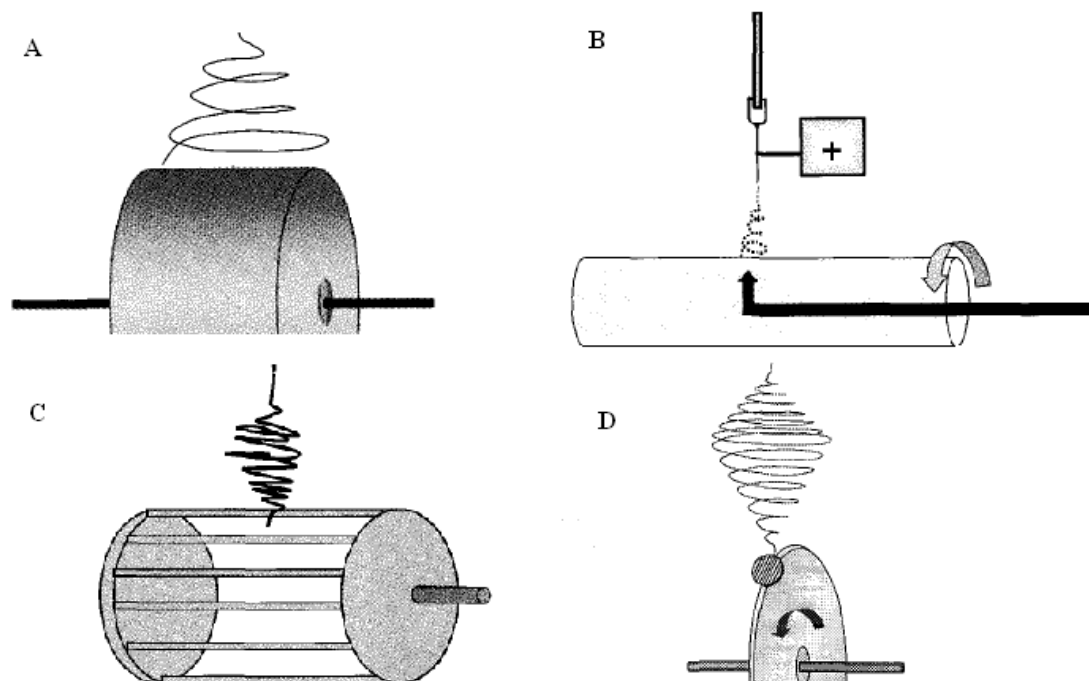
- *Razdalja igla-zbiral*

Razdalja med konico kovinske igle in zbiralom ima neposreden vpliv na čas potovanja curka in jakost električnega polja. Slednjega namreč določata uporabljena električna napetost ter

razdalja. Pri manjši razdalji tako curek potuje do zbiralca krajši čas, zaradi krajše razdalje in večje hitrosti, ki je posledica močnejšega električnega polja. Zaradi tega se lahko zgodi, da ni dovolj časa za zadostno izhlapevanje topila in to vodi do zlepljanja nanovlaken na zbiralu ali do tvorbe vozlov. Manjšanje razdalje med iglo in zbiralom ima podoben vpliv na proces kot višanje električne napetosti, saj ima oboje za posledico večjo jakost električnega polja. V nekaterih primerih sicer spreminjanje razdalje med iglo in zbiralom nima bistvenega vpliva na tvorbo in morfologijo nanovlaken. Vendar pa v večini primerov večanje razdalje vodi do vlaken manjšega premera, saj ima curek na voljo več časa za raztezanje in tanjšanje. To je ponovno možno le do neke meje, saj se nadaljnje večanje zaradi šibkejšega električnega polja izrazi v debelejših nanovlaknih. Tako tudi za razdaljo med iglo in zbiralom obstaja neko optimalno območje, ki omogoča uspešno tvorbo nanovlaken (1, 7).

- *Uporabljeno zbiralno*

Zbiralno pri elektrostatskem sukanju mora biti prevodno ter ozemljeno. S tem je omogočena tvorba stabilnega električnega polja med kovinsko iglo in zbiralom in hkrati preprečena akumulacija nabojev. Slednja bi se namreč izrazila v manjši gostoti dobljenih nanovlaken zaradi prisotnih odbojnih sil, ki so posledica rezidualnih nabojev. Uporabljeno zbiralno ima vpliv na količino, gostoto in usmerjenost dobljenih nanovlaken. Obstaja veliko različic zbiral, primeri nekaterih so zbrani na Sliki 11. Najpogosteje pa se uporablja planarna aluminijasta folija, nameščena na določenem nosilcu. Z uporabo rotirajočih zbiral lahko dobimo poravnana vlakna, medtem ko so na aluminijasti foliji nanovlakna urejena naključno (1, 7).



**Slika 11:** Različni tipi zbiral: A- vrteče vreteno, B- vrteč valj, C- vrteč boben, D- vrteč disk (1).

### 1. 3. 3. Vplivi okolja

- *Temperatura*

Temperatura vpliva na hitrost izhlapevanja topila, viskoznost polimerne raztopine ter topnost polimera v izbranem topilu. Pri višjih temperaturah je izhlapevanje topila hitrejša, viskoznost polimerne raztopine manjša, polimer pa je večinoma bolje topen. Slednje olajša raztegovanje polimernih verig, saj so le-te bolj mobilne, poleg tega pa je tudi sila, potrebna za razteg in podaljšanje, manjša. Kljub vsemu pa velja omeniti, da izdelava nanovlaken najpogosteje poteka pri sobni temperaturi (1).

- *Relativna vlažnost*

Vpliv relativne vlažnosti pri procesu elektrostatskega sukanja je moč videti v obliki por, ki se lahko pojavijo, kadar je v zraku prisotna veliko vlage. Vzrok temu je, da voda kondenzira na površini curka med samim procesom, saj se zaradi izhlapevanja topila ta površina ohlaja. To je še posebej izrazito pri uporabi lahko hlapnih topil. Relativna vlažnost tudi določa hitrost izhlapevanja topila, ta je namreč hitrejša pri nižji relativni vlažnosti. Uporaba lahko hlapnih topil lahko vodi do mašenja kovinske igle, saj je izhlapevanje topila hitrejša, kot odstranjevanje topila s konice igle. Visoka vlažnost v določenih primerih prepreči nastanek

gladkih nanovlaken, prav tako ima precejšen vpliv tudi na elektrostatske naboje, saj naj bi se pri višji vlažnosti dobljena nanovlakna na zbiralu hitreje in lažje razelektrila (1).

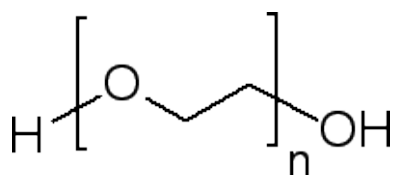
- *Vrsta atmosfere in tlak*

Čeprav tudi vrsta atmosfere in tlak lahko vplivata na izdelavo nanovlaken, sta ta dva parametra redkeje preučevana. Različni plini se namreč obnašajo drugače v močnem električnem polju, saj je na primer v helijevi atmosferi proces elektrostatskega sukanja onemogočen, ker helij spremeni lastnosti pod vplivom močnega električnega polja. Kar se tiče tlaka, njegovo znižanje povzroči, da polimerna raztopina lažje prehaja skozi kovinsko iglo, nadaljnje nižanje pa vodi v pojav mehurčkov na konici kovinske igle zaradi razlike v tlaku, kar onemogoči proces elektrostatskega sukanja (1, 24).

## 1. 4. Proučevani polimeri za izdelavo nanovlaken

### 1. 4. 1. Polietilenoksid (PEO)

PEO je neionski sintezni homopolimer etilenoksida, ki ga pridobivamo s kislo ali bazično katalizirano reakcijo med etilenoksidom in vodo, njegova strukturna formula je prikazana na Sliki 12. V literaturi se pojavlja tudi pod imenoma polietilenglikol (PEG) ali poli(oksietilen) (POE). Načeloma se PEG uporablja za polimere etilenoksida, katerih molekulska masa je pod 100.000 g/mol, za polimere višjih molekulskih mas pa se uporablja poimenovanje PEO, medtem ko je manj pogosto poimenovanje polioksietilen (POE). PEO je na tržišču na voljo v različnih molekulskih masah ( $M_w = 200 - 8.000.000$  g/mol), raztopine le-teh pa se med seboj razlikujejo po viskoznosti. Tako so PEO z nižjimi molekulskimi masami viskozne, brezbarvne tekočine, z višanjem molekulske mase nekje do 100.000 g/mol pa postanejo trdni in imajo izgled voskov (25, 26).



**Slika 12:** Strukturna formula polietilenoksida.

PEO, ki smo ga uporabljali v raziskavah, je bel pretočen prašek z rahlim vonjem po amoniaku. Topen je v vodi in mnogih organskih topilih (toluenu, acetonu, kloroformu itd.), netopen pa v alifatskih ogljikovodikih, etilen glikolu in večini alkoholov. Temperatura tališča je okrog 65 °C.

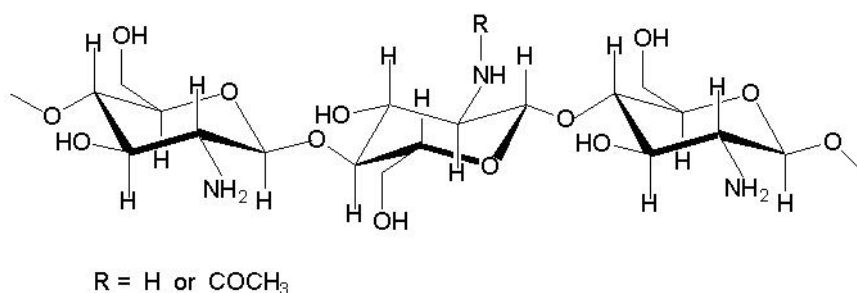
Zaradi njegove netoksičnosti PEO uporabljamo kot nosilni sistem ali ga kot pomožno snov uporabljamo v farmacevtski, kozmetični in prehranski industriji. V farmacevtski industriji ga v obliki 5 do 85 % raztopine uporabljamo kot vezivo in zgoščevalo, z uporabo PEO različnih molekulskih mas in stopnje nabrekanja pa je mogoče pripraviti sisteme s takojšnjim ali zadržanim sproščanjem. Primeren je za oblaganje tablet ali medicinskih pripomočkov, saj ob prisotnosti vode nabreka in je dobro drsilo, dodatno pa ima tudi zelo dobre mukoadhezivne lastnosti. Po aplikaciji se hitro in popolnoma izloči iz telesa v nespremenjeni obliki. Prečno premrežen PEO tvori hidrogel, ki ga lahko uporabljamo kot oblogo za rane (27, 28).

PEO je eden izmed prvih polimerov, iz katerih so bila narejena nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja in se danes v raziskavah še vedno zelo pogosto uporablja. Pri tvorbi

nanovlaken ga lahko uporabljamo kot samostojni polimer, vse več pa je raziskav, ki proučujejo nanovlakna iz raztopine PEO v kombinaciji z naravnimi polimeri (1, 2, 12).

#### 1. 4. 2. Hitosan (CH)

Hitosan, katerega strukturno formulo prikazuje Slika 13, je biokompatibilen, biorazgradljiv, naravni kationski polisaharid in linearni polimer oziroma poliamin, sestavljen iz glukozamina in N-acetil glukozamina. Nastane z delno deacetilacijo hitina, katerega glavni vir so celične stene nekaterih gliv ter zunanja ogrodja žuželk in rakov. Deacetilacija poteka pri povišani temperaturi v prisotnosti baze.



**Slika 13:** Strukturna formula hitosana.

Hitosan je na tržišču prisoten v različnih serijah, ki se med seboj razlikujejo v molekulski masi, stopnji deacetilacije ter viskoznosti, kar vpliva na njegove fizikalno-kemijske lastnosti. Za nizkomolekularni hitosan so značilne molekulske mase med 20 in 190 kDa in stopnja deacetilacije < 75%, visokomolekularni pa zajema molekulske mase med 190 in 375 kDa s stopnjo deacetilacije > 75%. Predvsem stopnja deacetilacije hitina določa hitosanu osnovno fizikalno lastnost, pozitiven naboj zaradi številnih protoniranih aminoskupin (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), ki mu omogoča vezavo na anionske snovi in negativno nabite površine ter njegovo topnost. Hitosan je topen v kisljih raztopinah pod pH 6, slabo pa je topen v organskih topilih, vodi in v alkalnem okolju. Zaradi svoje velike molekulske mase in linearne, nerazvejane zgradbe, hitosan omogoča povečanje viskoznosti snovi, ki so vezane nanj. Molekule hitosana so prožne, njihova konformacija je močno odvisna od ionske jakosti (29, 30, 31).

Hitosan ima poleg biokompatibilnosti in biorazgradljivost še druge ugodne biološke učinke, kot so pospeševanje celjenja ran, protiglivični učinek in stimulacija imunskega sistema, zaradi česar se zelo pogosto uporablja v biomedicinske namene, kot dostavni sistem za zdravila, material za tkivne nadomestke in obloge za celjenje ran (29, 30).



Elektrostatsko sukanje čistega hitosana je zaradi njegove velike viskoznosti že pri nizkih koncentracijah zelo oteženo. Prav zaradi tega ga ponavadi pri izdelavi nanovlaken kombiniramo z drugimi sintezniimi polimeri, kot sta PEO in PVA (7, 32 ).

## 2. NAMEN DELA

Dandanes so elektrostatsko sukana nanovlakna nedvomno predmet intenzivnih raziskav na biomedicinskem področju in predstavljajo najsodobnejšo obliko nanokompozitnega sistema. Kljub temu pa mehanizem elektrostatskega sukanja še vedno ni popolnoma pojasnjen. Dodatno predstavlja problem tudi ponovljivost samega postopka, predvsem zaradi številnih medsebojno odvisnih spremenljivk, ki vplivajo na nastanek in morfologijo nanovlaken. Prav zaradi tega je težko vnaprej napovedati, katere raztopine ter pod kakšnimi pogoji bodo tvorile nanovlakna, vse spremenljivke pa je potrebno eksperimentalno preveriti.

Namen diplomske naloge bo izdelati nanovlakna iz PEO z metodo elektrostatskega sukanja. Nanovlakna bomo izdelali iz polimernih raztopin PEO različnih koncentracij ter ob uporabi dveh polimerov različnih molekulskih mas. Za vsako raztopino posebej bomo proučili vpliv procesnih spremenljivk. Dobljena nanovlakna bomo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).

Prvi cilj diplomske naloge bo tako pripraviti širši nabor raztopin PEO ter ugotoviti, katere izmed njih so primerne za pripravo nanovlaken z elektrostatskim sukanjem. Nato bomo določili ustrezne pogoje, ki omogočajo potek procesa, kot so razdalja med iglo in zbiralom, pretok skozi iglo in električna napetost.

Drugi cilj diplomske naloge bo iz izbranih raztopin izdelati nanovlakna. Pri tem bomo najprej določili pogoje, ki omogočajo sam potek elektrostatskega sukanja, nato pa sistematično spreminjali uporabljeno električno napetost ter pretok. Nadalje bomo dobljene vzorce okarakterizirali ter ovrednotili morfologijo dobljenih nanovlaken ter uspešnost procesa elektrostatskega sukanja. Proučevali bomo premer dobljenih nanovlaken ter pojavnost in obliko vozlov v odvisnosti od posameznih spreminjajočih parametrov ter poskušali postaviti povezavo med njimi.

Ker je zaradi vse pogostejše uporabe nanovlaken v biomedicini prvotnega pomena njihova obstojnost in obnašanje v fizioloških pogojih, bo tretji cilj diplomske naloge proučiti stabilnost izdelanih nanovlaken v simuliranem fiziološkem okolju. Zato bomo dobljena nanovlakna stabilizirali z različnimi fizikalnimi metodami ter s kemijsko stabilizacijo s hitosanom. Stabilizirana nanovlakna bomo okarakterizirali in spremljali stopnjo ter hitrost hidratacije le-teh.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3. 1. Materiali

##### 3. 1. 1. Polimeri za pripravo raztopin in nanovlaken

- polietilenoksid (PEO)  $M_r = 400.000$  g/mol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- polietilenoksid (PEO)  $M_r = 900.000$  g/mol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- nizkoviskozen hitosan različnih molekulskih mas, viskoznost (1 % raztopine v očetni kislini pri 20 °C)  $\leq 200$  mPas, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija

##### 3. 1. 2. Reagenti za pripravo fosfatnega pufra

- natrijev klorid (>99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid (>99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat (99,0 - 102,0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (99,5 - 100,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

##### 3. 1. 3. Topila za pripravo raztopin in pufra

- destilirana voda
- očetna kislina, koncentrirana, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija

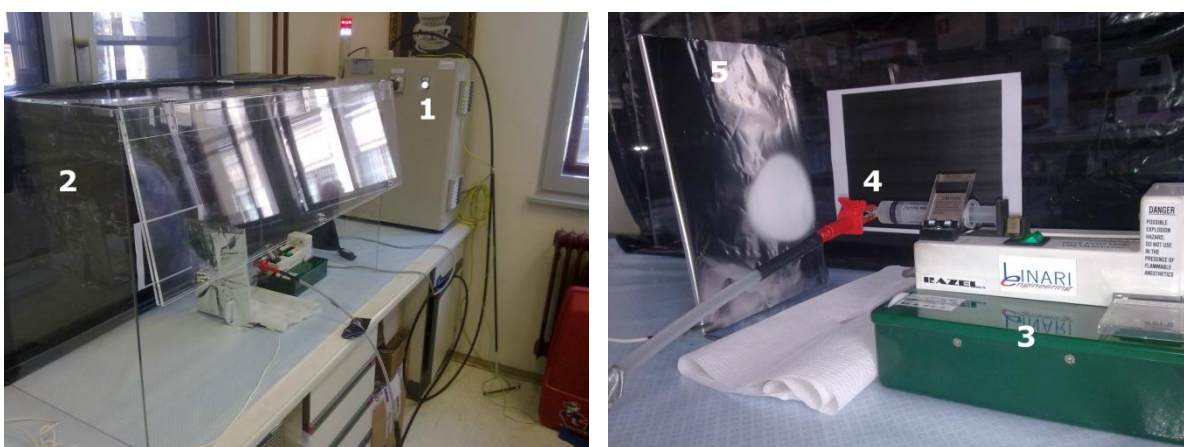
##### 3. 1. 4. Reagenti za stabilizacijo

- etanol
- metanol
- heksan
- glicerol
- glutaraldehid, 50 %, Merck KGaA, Schuchardt, Nemčija

#### 3. 2. Naprave

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- digitalna tehtnica, Sartorius BP310S, Göttingen, Nemčija
- magnetno mešalo, IKA WERKE, Nemčija
- vrstični elektronski mikroskop (SEM), JSM-7500F, JEOL, Japonska

- Aparatura za elektrostatsko sukanje, prikazana na Sliki 14 je sestavljena iz naslednjih komponent:
  - generator, model HVG-P50-R-EU, Linari Engineering s.r.l., Italija
  - črpalka, model R-99E, Razel Scientific, ZDA
  - kovinska igla, notranji premer 0,8 mm
  - plastična brizga, 20 mL, B. Braun
  - zbiralo, aluminijasta folija na plastičnem nosilcu.
  - plastična komora za zagotovljeno varnost pri delu



**Slika 14:** Aparatura za elektrostatsko sukanje. 1 - generator visoke električne napetosti, 2 - plastična komora, 3 - črpalka, 4 - kovinska igla, 5 - zbiralo.

### 3. 3. Postopki in metode

#### 3. 3. 1. Priprava polimernih raztopin

Pripravili smo polimerne raztopine različnih koncentracij iz PEO z različnima molekulskima masama, pri čemer je izbira koncentracijskega razpona temeljila na proučeni literaturi ter predhodnih eksperimentalnih podatkih.

Tako smo uporabili PEO z molekulsko maso 400.000 g/mol in 900.000 g/mol ter iz prvega pripravili 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 % in 8 % (m/m) raztopine, iz drugega pa raztopine s koncentracijami 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % in 6 % (m/m). Dodatno smo PEO nižje molekulske mase kombinirali še s hitosanom, saj je slednji zaradi stranskih funkcionalnih skupin omogočal stabilizacijo z glutaraldehidom. Pripravili smo 3 % (m/m) raztopine z masnimi razmerji PEO 400k:hitosan = 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 93:7 ter 97:3.

Raztopine čistega PEO smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali določeno količino PEO v obliki prahu ter dodali ustrezno količino prečiščene vode. Natehtane komponente smo nato pustili čez noč mešati na magnetnem mešalu, da se je polimer popolnoma raztopil in se je tvorila homogena raztopina.

Pri pripravi raztopin PEO v kombinaciji s hitosanom, smo najprej pripravili 3 % (m/m) raztopino PEO v vodi in 3 % (m/m) hitosana v 2 % (m/m) očetni kislini. Nato smo ti dve raztopini zmešali v različnih masnih razmerjih, vzorce pa nato pustili mešati še vsaj 6 ur, da smo dosegli stanje ravnotežja in homogeno porazdelitev polimerov v raztopini.

### **3. 3. 2. Elektrostatsko sukanje**

Izdelava nanovlaken z elektrostatskim sukanjem je potekala tako, da smo na 20 mL plastično brizgo pritrdili kovinsko iglo notranjega premera 0,8 mm ter vanjo nalili 5 - 10 mL polimerne raztopine, pri tem pa pazili, da se je v raztopino ujelo čim manj mehurčkov. Iz brizge smo nato iztisnili odvečen zrak, brizgo namestili na črpalko, ki je zagotavljala konstanten pretok skozi kovinsko iglo, ter nastavili želen pretok. Na plastični nosilec smo s pomočjo lepilnega traku pritrdili aluminijasto folijo, kar je predstavljalo naše zbiralo, ter ga postavili na ustrezno razdaljo od kovinske igle - v našem primeru je bila ta razdalja 15 cm. Aluminijasto folijo smo še ozemljili, na kovinsko iglo pa s pomočjo sponke priključili kabel, povezan z generatorjem, ki je dovajal električno napetost v območju 0 - 60 kV. S konice kovinske igle smo nato obrisali kapljico raztopine, če je bilo to potrebno, ter vključili vir električne napetosti. Za lažje opazovanje curka smo si pomagali s črnim ozadjem in z reflektorjem, zbiranje nanovlaken na zbiralu pa opazovali kot spremembo barve aluminijaste folije iz srebrne v belo.

### **3. 3. 3. Vrednotenje izdelanih nanovlaken**

Morfološke lastnosti izdelanih nanovlaken smo določali z uporabo SEM. Vzorce smo pripravili tako, da smo znotraj področja na aluminijasti foliji, kjer so bila zbrana nanovlakna, izrezali košček folije velikosti približno 5 x 5 mm ter ga s pomočjo dvostranskega prevodnega lepilnega traku (premer 12 mm, Oxford Instruments, Velika Britanija) pritrdili na ustrezne nosilce. SEM slike nanovlaken smo kasneje analizirali s pomočjo programa ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, ZDA), pri čemer smo povprečni premer nanovlaken določili iz vsaj 50 naključno izbranih nanovlaken, premer vozlov pa iz 20.

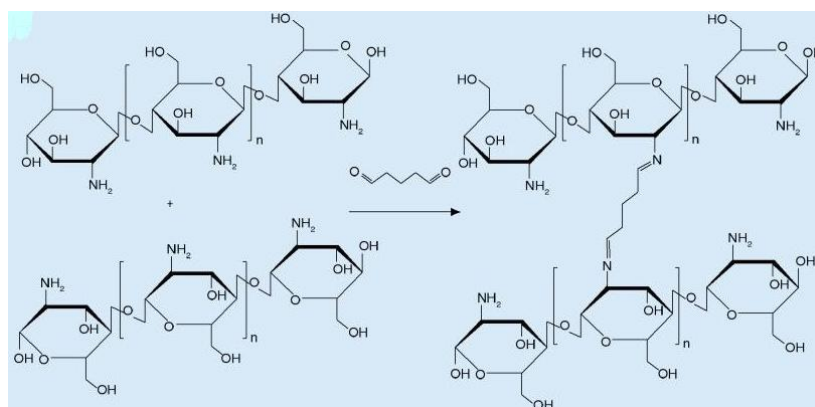
### **3. 3. 4. Priprava fosfatnega pufra (PBS)**

Da bi se kar najboljše približali fiziološkim pogojem, smo pri proučevanju stabilnosti izdelanih vlaken v mediju uporabili fosfatni pufer s pH 7,4. Za pripravo 1 litra pufra smo v bučko natehtali 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dodali 800 mL prečiščene vode, uravnali pH na 7,4 z 1 M NaOH in HCl ter dopolnili do oznake.

### **3. 3. 5. Stabilizacija izdelanih nanovlaken**

Najprej smo preverili stabilnost izdelanih (nestabiliziranih) PEO nanovlaken v fosfatnem pufri. To smo naredili tako, da smo izrezali košček aluminijaste folije z nanovlakni, jo stehali ter prelili s fosfatnim pufrom pH 7,4. Že s prosti očesom smo takoj ugotovili, da so se nanovlakna ob stiku s pufrom nemudoma raztopila, saj je bela barva folije izginila. Kljub temu pa smo košček aluminijaste folije po 10 minutah vzeli iz pufra, ga posušili in stehali. Masa se je zmanjšala, kar je potrdilo ugotovitev, da so se nanovlakna res raztopila, še dodaten dokaz za to pa je bilo dejstvo, da je bila folija po osušitvi takšne srebrne barve kot na začetku.

Nadalje smo nanovlakna PEO želeli stabilizirati, pri tem pa uporabili tako fizikalni kot kemijski način stabilizacije. Ker je glede na literaturne podatke možna stabilizacija določenih nanovlaken z namakanjem v netopilih, smo tudi mi poizkusili s to metodo. V ta namen smo izbrali etanol in metanol. Stabilizacijo smo izvedli tako, da smo izrezali košček aluminijaste folije z nanovlakni, ga stehali ter dali v petrijevko z etanolom oziroma metanolom in zaprli s parafilmom. Vzorce smo v tako pripravljeni komori pustili 24 ur, jih nato posušili na zraku ter ponovno stehali. Zaradi lažjega rokovanja smo v nadaljevanju vzorce pripravili na krovnih stekelcih in nekontaktni mrežici Tegaderm<sup>®</sup>, kar smo izvedli tako, da smo pred elektrostatskim sukanjem na aluminijasto folijo s prevodnim dvostranskim lepilnim trakom pritrdili omenjene nosilce. Poskusili smo tudi s termično stabilizacijo, tako da smo vzorce zavili v aluminijasto folijo ter jih postavili v sušilnik z vročim zrakom pri 160 °C za 20 minut. Nanovlakna izdelana iz kombinacije PEO in hitosana je po literaturnih podatkih možno prečno premrežiti. Velja še omeniti, da kemijsko premreženje ni mogoče pri nanovlaknih, izdelanih samo iz PEO, zaradi odsotnosti stranskih funkcionalnih skupin na površini, ki bi jih lahko premreževalec povezal. Nanovlakna iz PEO in hitosana smo torej stabilizirali s kemijsko stabilizacijo, pri čemer smo uporabili glutaralhid, ki premreži vlaknasto strukturo, kot prikazuje Slika 15. Prečno premreženje je potekalo tako, da smo vzorce z nanovlakni za 24 ur postavili v zaprto komoro, nasičeno z glutaralhidom, po stabilizaciji pa vzorce sprali z veliko količino prečiščene vode, da smo odstranili morebitne zaostanke glutaraldehida.



**Slika 15:** Shematski prikaz poteka kemijskega premreženja hitosana z uporabo glutaraldehida (33).

### 3. 3. 6. Spremljanje hidratacije izdelanih nanovlaken

Za spremljanje hidratacije nanovlaken, smo vzeli košček mrežice Tegaderm<sup>®</sup> velikosti približno 15 x 15 mm, na katerem so bila nanešena stabilizirana nanovlakna. Vsak vzorec posebej smo najprej stehali, jih dali v posebej oblikovane kovinske mrežice, nato pa v petrijevke ter prelili s fosfatnim pufrom pH 7,4. Kovinske mrežice smo uporabili za lažje rokovanje z vzorci, saj so omogočile boljše odcejanje in osušitev vzorcev. Vzorce smo nato v določenih časovnih intervalih (0, 0,25 h, 0,5 h, 0,75 h, 1,25 h, 1,75 h, 2 h, 2,5 h, 4 h, 6 h, 24 h, 72 h, 144 h) z mrežico vred previdno vzeli iz pufra, pustili da je večina tekočine odtekla, jih osušili s krpicco, ki ne odpušča delcev, ter jih stehali. Za vsak vzorec smo naredili tri paralelke, rezultate pa prikazali kot odstotek spremembe mase vzorcev v odvisnosti od časa.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4. 1. Izbor raztopin in določanje pogojev elektrostatskega sukanja

Iz izbranega nabora polimernih raztopin smo morali najprej določiti, katere raztopine imajo ustrezne lastnosti, ki omogočajo tvorbo in vzdrževanje curka. Kot že v uvodu omenjeno, sta za stabilen curek bistvena zadostna, a ne prevelika, viskoznost raztopin in koncentracija polimera, ki omogoča preplet polimernih verig in s tem stabilen kontinuiran curek. Na začetku smo se tako pri ocenjevanju primernosti raztopin osredotočili zlasti na opazovanje curka. Če je bil ta stabilen in neprekinjen, smo raztopino smatrali kot primerno za elektrostatsko sukanje. Ker je za pregledno in smiselno vrednotenje ter neposredno medsebojno primerjavo raztopin in nastalih nanovlaken pomembno, da so pogoji kar se da konstantni, je bila uporabljena razdalja od igle do zbirala v vseh primerih 15 cm, prav tako pa smo se trudili ves čas uporabiti enak pretok, in sicer 0,707 mL/h, saj se je v večini primerov izkazal kot najbolj ustrezen. V primerih, kadar se je iz raztopine tvoril curek, ki pa se je nato vmes prekinjal, smo morali pretok vendarle spremeniti. Iz Preglednic 1 in 2 je tako razvidno, katere raztopine so imele ustrezne lastnosti za vzdrževanje stabilnega curka med elektrostatskim sukanjem, prav tako pa je mogoče razbrati tudi potreben pretok za vzdrževanje curka.

**Preglednica 1:** Nabor izbranih raztopin **PEO 400k**, zbran v preglednici, iz katere je razvidno, katere raztopine so sposobne tvoriti stabilen curek. Dodatno je razviden tudi potreben pretok polimerne raztopine pri določenih napetostih v **mL/h**.

| Koncentracija (%) | Pretok (mL/h) |       |       |       |
|-------------------|---------------|-------|-------|-------|
|                   | 10 kV         | 15 kV | 20 kV | 25 kV |
| 0.5               | 0.707         | 0.707 | 0.707 | 2.828 |
| 1                 | 0.707         | 0.707 | 1.414 | 2.828 |
| 2                 | 0.707         | 0.707 | 1.414 | 1.414 |
| 3                 | 0.707         | 0.707 | 0.707 | 2.121 |
| 4                 | 0.707         | 0.707 | 2.121 | 2.121 |
| 5                 | 0.707         | 0.707 | 0.707 | 0.707 |
| 6                 | 0.707         | 0.707 | 0.707 | 0.707 |
| 7                 | /             | /     | /     | /     |
| 8                 | /             | /     | /     | /     |



**Preglednica 2:** Nabor izbranih raztopin **PEO 900k**, zbran v preglednici iz katere je razvidno, katere raztopine so sposobne tvoriti stabilen curek. Dodatno je razviden tudi potreben pretok polimerne raztopine pri določenih napetostih v mL/h.

| Koncentracija (%) | Pretok (mL/h) |        |        |       |
|-------------------|---------------|--------|--------|-------|
|                   | 10 kV         | 15 kV  | 20 kV  | 25 kV |
| 0.5               | 0.3535        | 0.707  | /      | /     |
| 1                 | 0.3535        | 0.707  | 1.414  | 4.242 |
| 2                 | 0.3535        | 1.0605 | 2.4745 | 2.828 |
| 3                 | 0.707         | 0.707  | 0.707  | 2.121 |
| 4                 | 0.707         | 0.707  | 0.707  | 0.707 |
| 5                 | 0.707         | 0.707  | 0.707  | 0.707 |
| 6                 | /             | /      | /      | /     |

Iz dobljenih podatkov je jasno vidno, da je z višanjem električne napetosti včasih potreben večji pretok za tvorbo stabilnega curka. Z višanjem napetosti se namreč ob nespremenjeni razdalji do zbiralne veče jakost električnega polja, kar povzroči večjo hitrost curka, s tem pa je odstranjevanje raztopine s konice igle večje. Posledično tako pri enakem pretoku na konici igle ni dovolj raztopine za tvorbo curka, najverjetneje pa se tudi manjša Taylorjev stožec, kar vse vodi v prekinjanje curka in njegovo nestabilnost.

Pri raztopinah PEO 400k koncentracij 7 % in 8 %, je bilo elektrostatsko sukanje onemogočeno, saj sta bili raztopini preveč koncentrirani in posledično preveč viskozni, kar je oteževalo prehajanje skozi kovinsko iglo. Poleg tega je zaradi počasnega odnašanja prihajalo do sušenja polimerne raztopine na konici igle in nastanka zamaška, ki je oviral nadaljnje potiskanje raztopine skozi iglo. Ob uporabi PEO 900k se je enako zgodilo pri 6 % raztopini.

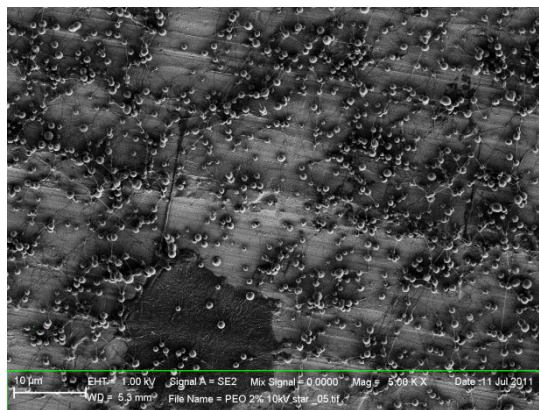
## 4. 2. Vrednotenje izdelanih nanovlaken

### 4. 2. 1. Vpliv uporabljene električne napetosti

Uporabljena električna napetost ima v veliki večini med procesnimi spremenljivkami največji vpliv na morfologijo in premer izdelanih nanovlaken. Prav zaradi tega smo pri elektrostatskem sukanju spreminjali le to spremenljivko, ostale pogoje pa ohranjali konstante (razdalja 15 cm, pretok 0,707 mL/h), razen seveda v primerih, ko je bilo treba pretok za potrebe neprekinjenega curka zvečati ali zmanjšati.

#### 4. 2. 1. 1. PEO molekulske mase 400.000 g/mol

Za raztopine PEO 400k koncentracij nižjih od 4 % se je po SEM analizi slik izkazalo, da elektrostatsko sukanje ni bilo uspešno, saj do nastanka nanovlaken ni prišlo. Čeprav je s prostim očesom izgledalo, kot da se na zbiralu nabirajo vlakna, pa tudi curek je bil stabilen in neprekinjen, so SEM slike pokazale, da so se na zbiralu nabrale le suhe kapljice polimera, ki so prikazane na Sliki 16.



**Slika 16:** SEM slika kapljic na zbiralu pri povečavi 5.000-krat, po elektrostatskem sukanju 2 % raztopine PEO 400k pri napetosti 10 kV.

Vzrok za nastanek kapljic je v splošnem mogoče iskati bodisi v nizki koncentraciji polimera in s tem nizki viskoznosti ter nezadostnemu prepletu polimernih verig bodisi v nesorazmerju sil površinske napetosti in viskoznosti. V našem primeru je razlog najverjetneje slednji, saj sposobnost tvorbe curka nakazuje, da je prepletov v raztopini dovolj, čeprav je viskoznost nizka. Očitno pa so sile površinske napetosti tako visoke, da prevladajo nad viskoelastičnostjo, ki sicer omogoča raztegovanje curka, zato se posledično curek pred zbiralom razbije v kapljice.

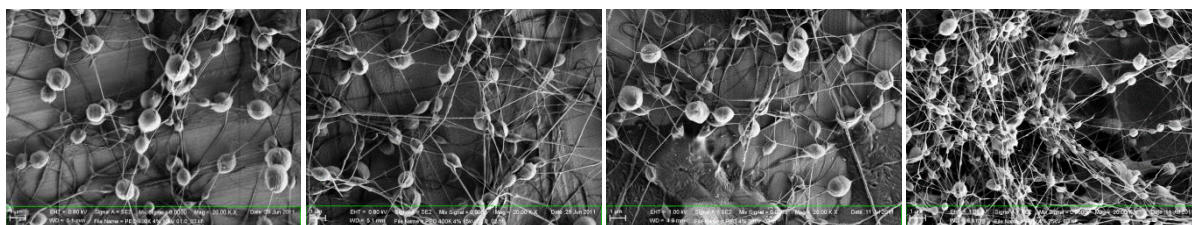
Nadalje smo ugotovili, da so nastala nanovlakna pri elektrostatskem sukanju raztopin s polimerno koncentracijo od 4 do 6 %. Pri tem so v odvisnosti od uporabljene napetosti nastala nanovlakna z vozli ali gladka nanovlakna, kar je predstavljeno v nadaljevanju. Ker so te raztopine že na prvi pogled imele večjo viskoznost, to potrjuje našo ugotovitev iz prejšnjega odstavka glede nesorazmernosti sil pri raztopinah z nižjo viskoznostjo.

- 4 % polimerna raztopina PEO 400k

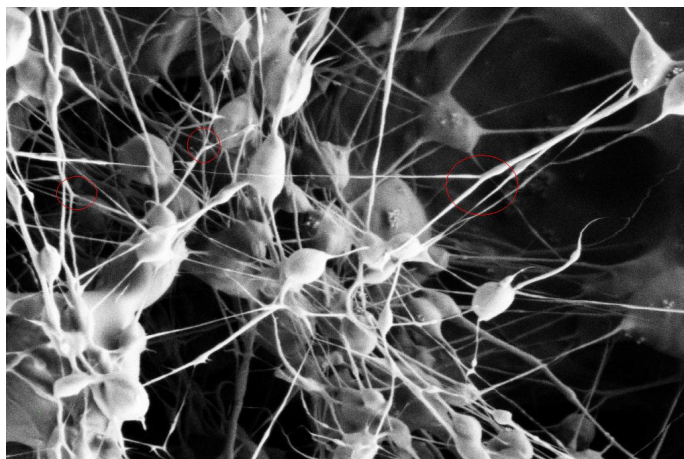
Na Sliki 17 je vidno, da smo iz 4 % raztopine ne glede na uporabljeno napetost dobili nanovlakna z veliko pojavnostjo vozlov, ki so najverjetneje še posledica prevladujoče sile površinske napetosti, ki teži k zmanjšanju površine na enoto mase. Preglednica 3 prikazuje premer vlaken in vozlov v odvisnosti od uporabljene napetosti. Ugotovili smo, da se premer nanovlaken med vozli z naraščanjem napetosti manjša, medtem ko se debelina vozlov izrazito ne spreminja, razen pri uporabljeni najvišji napetosti 25 kV. Zmanjšanje premera pri višjih napetostih je posledica večjega raztezanja polimernih verig zaradi večjih elektrostatskih odbojnih sil, vnesenih v raztopino, pa tudi posledica razcepljenih vlaken, prikazanih na sliki 18, ki nastanejo zaradi tvorbe sekundarnih curkov predvsem pri višjih napetostih.

**Preglednica 3:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz **4 % raztopine PEO 400k**, v odvisnosti od napetosti.

| Napetost(kV) | vlakna      |       | Vozli       |        |
|--------------|-------------|-------|-------------|--------|
|              | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 10           | 86.93       | 20.06 | 972.06      | 295.07 |
| 15           | 60.2        | 16.9  | 787.76      | 210.66 |
| 20           | 54.18       | 15.72 | 922.65      | 286.12 |
| 25           | 33.82       | 9.55  | 333.34      | 131.31 |



**Slika 17:** SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz **4 % raztopine PEO 400k** pri različnih napetostih. Od leve proti desni **10kV, 15kV, 20kV in 25kV** pri **20.000**-kratni povečavi.



**Slika 18:** SEM slika razcepljenih vlaken, ki so posledica tvorbe sekundarnih curkov med elektrostatskim sukanjem (označena z rdečo). Vlakna so izdelana iz raztopine **4 % PEO 400k** pri napetosti **25 kV**, povečava: **50.000 X**.

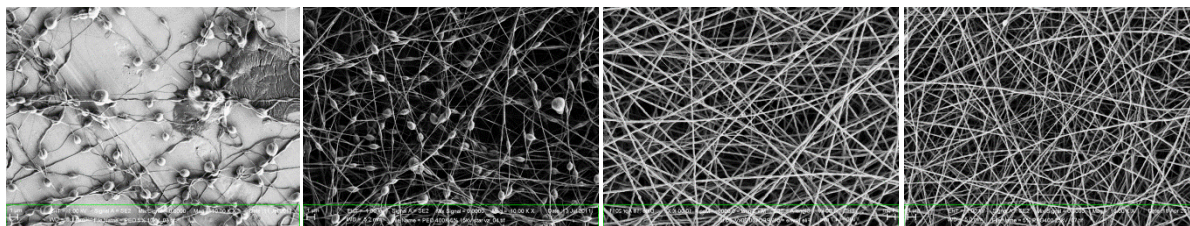
- 5 % polimerna raztopina

Iz 5 % polimerne raztopine smo pri nižjih napetostih (10 in 15 kV) dobili nanovlakna z vozli, pri višjih (20 in 25 kV) pa gladka nanovlakna. Slika 19 jasno prikazuje prehod med njimi. Na osnovi podatkov iz Preglednice 4 smo ugotovili, da se premer nanovlaken pri povišanju napetosti z 10 kV na 15 kV zmanjša, kar je v skladu s predpostavko, da višja napetost vodi do tanjšanja curka. Po drugi strani pa se je ob uporabi napetosti 20 kV premer povečal in je pravzaprav podoben kot pri 10 kV, vendar s pomembno razliko da v tem primeru dobimo popolnoma gladka nanovlakna. Prav zaradi tega lahko sledeče rezultate pripišemo dejstvu, da pri 20 kV ni več prisotnega kopičenja polimera v vozlih, posledično ga je zato več za tvorbo nanovlaken in vlakna so debelejša. To potrjuje tudi dejstvo, da se premer gladkih nanovlaken ponovno zmanjša ob uporabi napetosti 25 kV, kar je v skladu s pričakovanimi rezultati.

**Preglednica 4:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz **5 % raztopine PEO 400k**, v odvisnosti od napetosti.

| Napetost(kV) | vlakna      |       | Vozli       |        |
|--------------|-------------|-------|-------------|--------|
|              | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 10           | 155.31      | 30.46 | 798.48      | 162.54 |
| 15           | 75.88       | 13.41 | 711.62      | 208.29 |
| 20           | 159.74      | 23.78 | /           | /      |
| 25           | 125.07      | 21.75 | /           | /      |





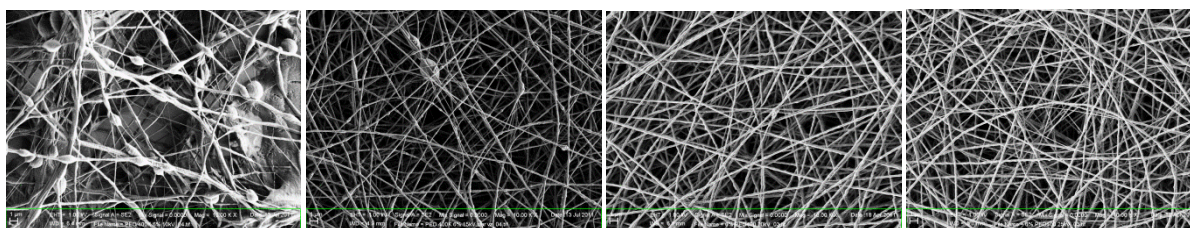
**Slika 19:** SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz **5 % raztopine PEO 400k**, pri različnih napetostih. Od leve proti desni **10kV, 15kV, 20kV in 25kV** pri **10.000**-kratni povečavi.

- 6 % polimerna raztopina

Morfologija nanovlaken, izdelanih iz 6 % raztopine pri napetosti 10 kV še vedno izkazuje pogosto pojavnost vozlov, kar vidimo na Sliki 20, se pa slednji ob višanju napetosti na 15 kV izrazito zmanjšajo ter so vidni le še kot posamezne odebelitve na vlaknih, pri višjih napetostih pa jih več ni. Kot je razvidno iz Preglednice 5, smo pri premeru vlaken opazili enak trend, kot pri vlaknih iz 5 % raztopine – premer se je najprej zaradi večjih sil zmanjšal, nato se je ob pojavu vlaken brez vozlov ponovno nekoliko povečal in se ob uporabi še višje napetosti nato zmanjšal. Hkrati smo ugotovili, da se je ob višanju napetosti zmanjšal tudi premer vozlov, prav tako pa se je spremenila njihova oblika iz sferične v bolj podolgovato, kar jasno nakazuje na močnejše elongacijske sile.

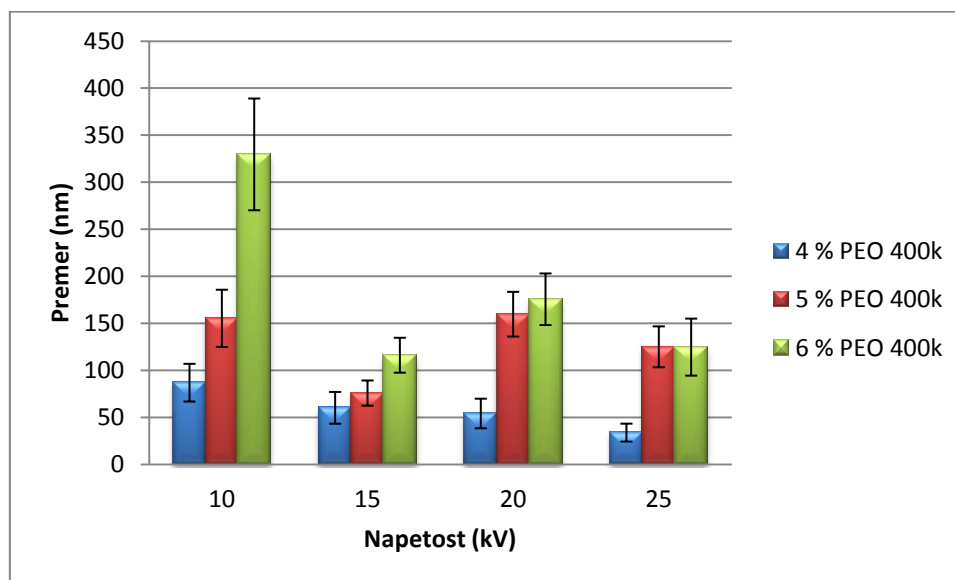
**Preglednica 5:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz **6 % raztopine PEO 400k**, v odvisnosti od napetosti.

| Napetost(kV) | vlakna      |       | Vozli       |        |
|--------------|-------------|-------|-------------|--------|
|              | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 10           | 329.68      | 59.41 | 1189.68     | 338.09 |
| 15           | 116.13      | 18.55 | 272.84      | 50.95  |
| 20           | 175.66      | 27.42 | /           | /      |
| 25           | 124.75      | 30.31 | /           | /      |



**Slika 20:** SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz **6 % raztopine PEO 400k** pri različnih napetostih. Od leve proti desni **10kV, 15kV, 20kV in 25kV** pri **10.000**-kratni povečavi.

Graf 1 prikazuje zbrane rezultate elektrostatskega sukanja vseh treh raztopin, iz katerih so nastala nanovlakna, v odvisnosti od uporabljene napetosti. Iz grafa je lepo vidno, da se premer vlaken manjša z naraščanjem napetosti le v tistem območju napetosti, ko vmes ne pride do spremembe morfologije nanovlaken.



**Graf 1:** Premer vlaken v odvisnosti od napetosti za PEO 400k.

#### 4. 2. 1. 2. PEO molekulske mase 900.000 g/mol

V primeru PEO 900k je bila tvorba curka možna iz vseh raztopin, razen iz 6 % raztopine, ki je bila preveč viskozna, da bi bil omogočen prehod polimerne raztopine skozi kovinsko iglo. SEM analiza slik je pokazala, da so pri raztopinah nižje koncentracije, in sicer 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, nastala nanovlakna z vozli le pri napetosti 15 kV, pri ostalih napetostih pa vlakna niso nastala. Za te raztopine tako vpliva napetosti ne moremo ugotavljati. Tvorba nanovlaken pri vseh uporabljenih napetostih pa je bila uspešna pri 4 % in 5 % raztopini, vendar je tudi tukaj možno opaziti prisotnost vozlov na vlaknih, popolnoma gladka nanovlakna so nastale le pri elektrostatskem sukanju 4 % raztopine pri napetosti 15 kV. Med eksperimentalnim delom smo opazili, da so pri sukanju 3 % raztopine pri napetosti 25 kV na zbiralu nastali mokri madeži, kar bi lahko kazalo na nezadostno izhlapevanje topila. Ker tega ni bilo opaziti pri raztopinah višjih koncentracij, kjer je izhlapevanje topila zaradi večje viskoznosti še bolj oteženo, sklepamo, da vzrok ni v nezadostnem izhlapevanju topila, temveč je možno, da je bil uporabljen pretok prevelik, saj smo ga za ohranjanje stabilnega curka morali povečati na 2,121 mL/h.

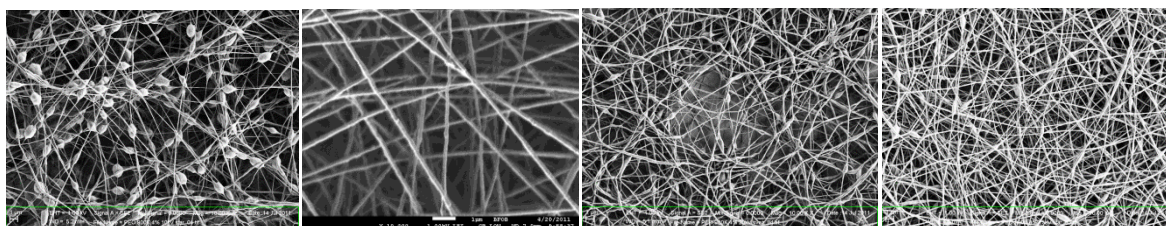
V nadaljevanju smo podrobneje preučili 4 % in 5 % raztopino PEO 900k, saj bomo iz raztopin z isto koncentracijo v nadaljevanju lahko ugotavljali vpliv molekulske mase na morfologijo vlaken pri konstantni napetosti.

- 4 % polimerna raztopina

Kot že omenjeno, so pri elektrostatskem sukanju 4 % raztopine nastala nanovlakna z vozli pri napetostih 10 kV, 20 kV in 25 kV, gladka nanovlakna pa le pri 15 kV, kot vidimo na Sliki 21. Sklepamo torej, da je pri tej napetosti razmerje sil znotraj curka optimalno in omogoča nastanek vlaken brez vozlov. Nadalje smo ugotovili, da se premer vlaken med vozli z napetostjo bistveno ne spreminja, medtem ko se ponovno poveča, ko nastanejo popolno gladka vlakna. Kot je razvidno iz Preglednice 6, pa so se z napetostjo nekoliko zmanjšali vozli, njihova oblika pa je zaradi večjih odbojnih sil postala tudi bolj podolgovata.

**Preglednica 6:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz **4 % raztopine PEO 900k**, v odvisnosti od napetosti.

| Napetost(kV) | vlakna      |       | vozli       |        |
|--------------|-------------|-------|-------------|--------|
|              | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 10           | 112.17      | 34.99 | 875.42      | 151.67 |
| 15           | 230.81      | 33.92 | /           | /      |
| 20           | 103.45      | 21.15 | 553.14      | 76.41  |
| 25           | 107.94      | 22.2  | 497.08      | 104.23 |



**Slika 21:** SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz **4 % raztopine PEO 900k** pri različnih napetostih. Od leve proti desni **10kV, 15kV, 20kV in 25kV** pri **10.000**-kratni povečavi.

- 5 % polimerna raztopina

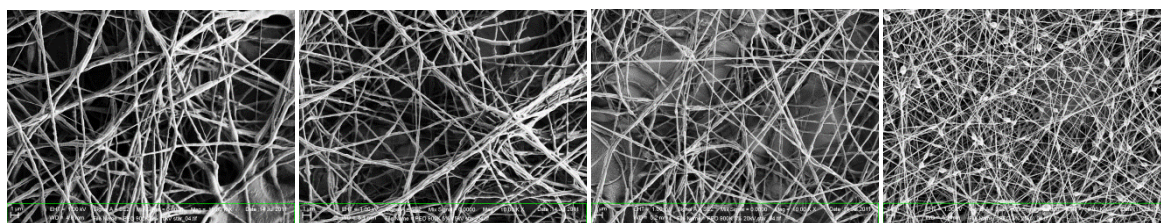
Pri elektrostatskem sukanju 5 % raztopine smo ne glede na uporabljen napetost vedno dobili nanovlakna z vozlasto morfologijo, kar je vidno na Sliki 22. Preglednica 7 prikazuje premer vlaken in vozlov, dobljenih ob določeni napetosti. Vidimo lahko, da se premer nanovlaken z višanjem napetosti enakomerno manjša, kar je posledica delovanja že večkrat omenjenih odbojnih sil znotraj curka, ki vodijo do intenzivnejšega raztegovanja polimernih verig.

Opazili smo tudi posamezna zlitja med vlakni pri napetosti 10 kV, kar pripisujemo nezadostnemu sušenju vlaken med potovanjem curka. Omenjen pojav je v splošnem lahko posledica premajhne razdalje od igle do zbiralca, premalo hlapnega topila ali prevelikega pretoka, prav tako lahko na to vpliva tudi previsoka relativna vlažnost v komori, saj je tako oteženo izhlapevanje topila. Raziskave so pokazale, da je pri višjih napetostih izhlapevanje topila večje, pri nižjih pa manjše. Slednje je najverjetnejši vzrok za dobljen rezultat, saj smo ta pojav opazili le pri najnižji napetosti, medtem ko so bili vsi ostali parametri (razdalja od igle do zbiralca, pretok) konstantni. Tudi povišanje relativne vlažnosti v komori verjetno ni bil vzrok za nezadostno sušenje, saj je bilo elektrostatsko sukanje pri vseh napetostih izpeljano v časovnem okviru 2 ur.

Rezultati so dodatno pokazali, da se z naraščajočo napetostjo do 20 kV manjša tudi velikost vozlov, medtem ko se pri najvišji napetosti njihova velikosti ponovno nekoliko poveča, postanejo pa celo bolj izraziti (pri nižjih napetostih so namreč vidni le kot odebelitve na vlaknih). Dobljen rezultat je tako dokaz, da višanje napetosti res vodi v izboljšanje morfologije nanovlaken, vendar le do določene mere, nato pa se pojav vozlov spet zveča. Slednje je najverjetneje povezano z manjšanjem Taylorjevega stožca do te mere, da se ta prestavi v notranjost kovinske igle, kar pa poveča število nepravilnosti na vlaknih.

**Preglednica 7:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz **5 % raztopine PEO 900k**, v odvisnosti od napetosti.

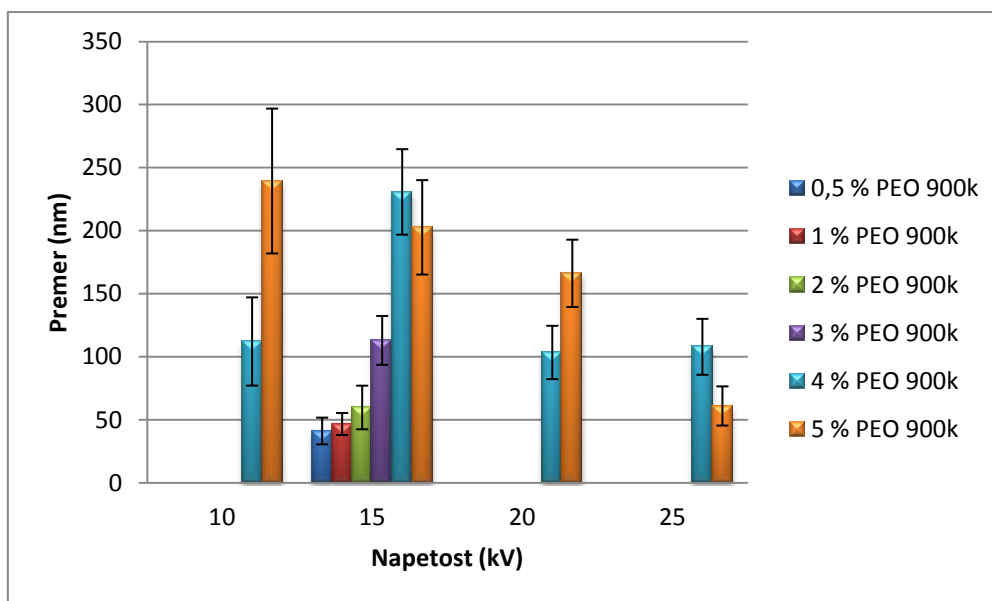
| Napetost(kV) | vlakna      |       | vozli       |        |
|--------------|-------------|-------|-------------|--------|
|              | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 10           | 239.48      | 57.45 | 904.19      | 196.17 |
| 15           | 202.72      | 37.46 | 438.74      | 84.73  |
| 20           | 166.21      | 26.7  | 385.45      | 43.99  |
| 25           | 61.02       | 15.56 | 506.41      | 104.86 |



**Slika 22:** SEM slike vlaken in vozlov, izdelanih iz **5 % raztopine PEO 900k** pri različnih napetostih. Od leve proti desni **10kV, 15kV, 20kV in 25kV** pri **10.000**-kratni povečavi.



V grafu 2 so zbrani premeri vlaken, izdelanih iz raztopin PEO 900k, v odvisnosti od napetosti. Sklepamo lahko, da je napetost 15 kV optimalna za tvorbo vlaknastih struktur, saj ta nastanejo pri vseh uporabljenih koncentracijah, vendar pa vlakna brez vozlov nastanejo le iz 4 % raztopine. Podobno kot v primeru PEO 400k se tudi tukaj premer znatno poveča, ko iz vozlastih nanovlaken nastanejo gladka, ob nespremenjeni morfologiji pa se ponovno izkaže, da se premer vlaken in vozlov z naraščanjem napetosti zmanjša.



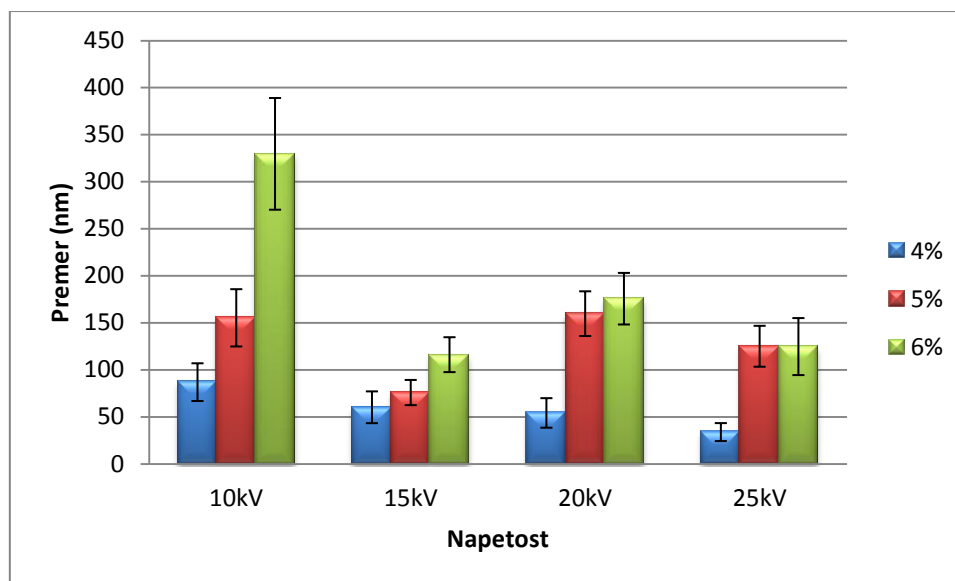
**Graf 2:** Premer vlaken v odvisnosti od napetosti za **PEO 900k**.

#### 4. 2. 2. Vpliv koncentracije polimerne raztopine

Ker je eden od ciljev diplomskega dela preučiti vlogo posameznih spremenljivk na morfologijo dobljenih nanovlaken, smo za ugotavljanje vpliva koncentracije polimerne raztopine analizirali premere nanovlaken, izdelanih iz polimernih raztopin različnih koncentracij pri konstantnih procesnih pogojih (razdalja do zbirala, uporabljena napetost, pretok).

- PEO 400k

Graf 3 prikazuje premer vlaken v odvisnosti od koncentracije polimerne raztopine PEO 400k pri določenih napetostih.



**Graf 3:** Vpliv koncentracije polimerne raztopine **PEO 400k** na premer vlaken pri različnih napetostih.

Ugotovili smo, da se premer vlaken z višanjem koncentracije večja ne glede na uporabljeno napetost. Rezultati so v skladu s pričakovanimi, saj višja koncentracija pomeni večje preplete polimernih verig in tudi večji masni pretok polimera pri ostalih konstantnih pogojih, kar vodi do nastanka debelejših vlaken. Nadalje smo opazili, da je povečanje premera manj izrazito v primerih nastanka gladkih nanovlaken, kot takrat ko so na vlaknih prisotni tudi vozli (pri napetostih 20 kV in 25 kV iz 5 in 6 % raztopine), pri napetosti 25 kV je premer vlaken, izdelanih iz 5 % in 6 % raztopine, celo enak.

Drugačen trend pa je moč opaziti pri premeru vozlov. Ta se pri napetosti 10 kV znatno ne spreminja s koncentracijo, pri 15 kV pa se pri najvišji koncentraciji (6 %) premer precej zmanjša, kar jasno nakazuje, da prihaja do večje raztegnitve polimernih verig. Vzrok za to je najverjetneje dejstvo, da sila površinske napetosti zaradi višje viskoznosti polimerne raztopine nima več prevladujočega vpliva. Pri 20 in 25 kV nastanejo vozli le pri 4 % raztopini, se pa slednji ob prehodu na najvišjo napetost zmanjšajo kar za trikrat. Podrobnejši podatki o premerih vlaken in vozlov so podani v preglednicah 8-11.

**Preglednica 8:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin **PEO 400k** različnih koncentracij pri napetosti **10 kV**.

| koncentracija(%) | vlakna      |       | vozli       |        |
|------------------|-------------|-------|-------------|--------|
|                  | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 4                | 86.93       | 20.06 | 972.06      | 295.07 |
| 5                | 155.31      | 30.46 | 798.48      | 162.54 |
| 6                | 329.68      | 59.41 | 1189.68     | 338.09 |

**Preglednica 9:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin **PEO 400k** različnih koncentracij pri napetosti **15 kV**.

| koncentracija(%) | vlakna      |       | vozli       |        |
|------------------|-------------|-------|-------------|--------|
|                  | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 4                | 60.2        | 16.9  | 787.76      | 210.66 |
| 5                | 75.88       | 13.41 | 711.62      | 208.29 |
| 6                | 116.13      | 18.55 | 272.84      | 50.95  |

**Preglednica 10:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin **PEO 400k** različnih koncentracij pri napetosti **20 kV**.

| koncentracija(%) | vlakna      |       | vozli       |        |
|------------------|-------------|-------|-------------|--------|
|                  | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 4                | 54.18       | 15.72 | 922.65      | 286.12 |
| 5                | 159.74      | 23.78 | /           | /      |
| 6                | 175.66      | 27.42 | /           | /      |

**Preglednica 11:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin **PEO 400k** različnih koncentracij pri napetosti **25 kV**.

| koncentracija(%) | vlakna      |       | vozli       |        |
|------------------|-------------|-------|-------------|--------|
|                  | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 4                | 33.82       | 9.55  | 333.34      | 131.31 |
| 5                | 125.07      | 21.75 | /           | /      |
| 6                | 124.75      | 30.31 | /           | /      |

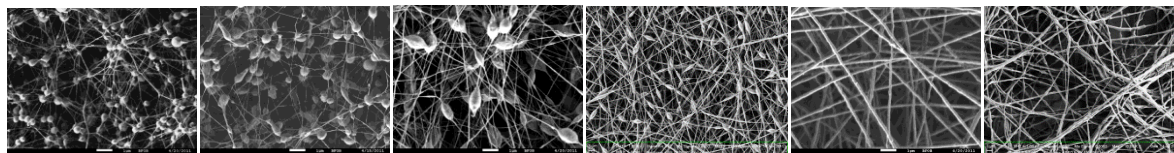
- PEO 900k

Za PEO 900k smo vpliv koncentracije na premer nanovlaken ugotavljali le pri napetosti 15 kV, saj so le takrat nastala vlakna iz polimernih raztopin vseh uporabljenih koncentracij. Premeri vlaken in vozlov so zbrani v Preglednici 12, iz Grafa 4 pa je jasno razvidno, da se premer vlaken veča z naraščanjem koncentracije polimerne raztopine do 4 %. To lahko, kot že v primeru PEO 400k, pojasnimo s tem, da je pri istem pretoku pri višjih koncentracijah na voljo več polimera za tvorbo curka pri elektrostatskem sukanju. Nadalje smo ugotovili, da se odstopanje od tega trenda pojavi v primeru 4 % raztopine, kjer se premer močno poveča in je celo večji kot pri vlaknih iz 5 % raztopine. Ker iz 4 % polimerne raztopine, za razliko od drugih, nastanejo gladka vlakna, kot je vidno na Sliki 23, je omenjen pojav v skladu s

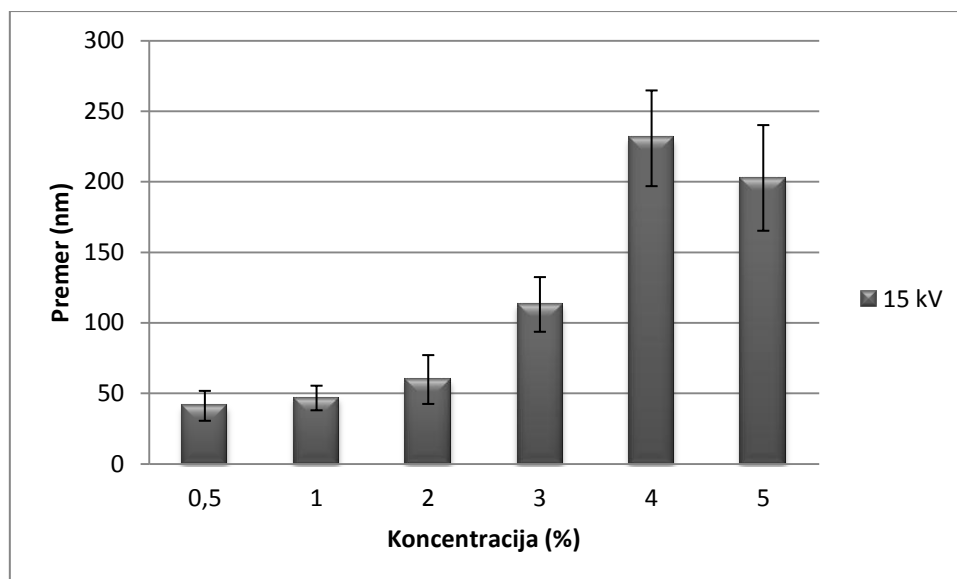
prejšnjimi rezultati. Pri vseh vlaknih, kjer prihaja do prehoda iz vozlastne v gladko vlaknasto strukturo, smo namreč opazili znatno povečanje premera, kar pojasnujemo z dejstvom, da zaradi odsotnosti vozlov ni kopičenja polimera v le-teh in posledično je več polimera na voljo za tvorbo vlaken, ki so debelejša. Ponovno lahko sklepamo, da sprememba morfologije vlaken odločilno vpliva na njihov premer, sama morfologija pa je v veliki meri odvisna od viskoznosti polimerne raztopine, ki jo v največji meri določa koncentracija polimerne raztopine.

**Preglednica 12:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz polimernih raztopin **PEO 900k** različnih koncentracij pri napetosti **15 kV**.

| Koncentracija (%) | Vlakna      |       | vozli       |        |
|-------------------|-------------|-------|-------------|--------|
|                   | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 0.5               | 41.17       | 10.6  | 433.82      | 73.08  |
| 1                 | 46.71       | 8.72  | 500.43      | 114.2  |
| 2                 | 59.81       | 17.32 | 593.93      | 189.65 |
| 3                 | 113.03      | 19.38 | 628.62      | 136.11 |
| 4                 | 230.81      | 33.92 | /           | /      |
| 5                 | 202.72      | 37.46 | 438.74      | 84.73  |



**Slika 23:** SEM slike vlaken in vozlov pri **10.000**-kratni povečavi, izdelanih pri napetosti **15 kV** iz polimernih raztopin **PEO 900k** različnih koncentracij - od leve proti desni: **0.5 %**, **1 %**, **2 %**, **3 %**, **4 %**, **5 %**.



**Graf 4:** Premer vlaken, izdelanih iz polimernih raztopin **PEO 900k**, v odvisnosti od koncentracije raztopin pri napetosti **15 kV**.

#### 4. 2. 3. Vpliv molekulske mase polimera

V nadaljevanju smo ugotavljali vpliv molekulske mase polimera, uporabljenega za izdelavo nanovlaken, na premer in morfologijo le-teh. Primerjali smo nanovlakna iz PEO z molekulskima masama 400.000 g/mol in 900.000 g/mol. Pri tem smo za ugotavljanje vpliva uporabili raztopini vsakega od polimerov s koncentracijama 4 % in 5 %, vse ostale parametre pa smo ob tem ohranili konstantne. Omenjeni koncentraciji sta bili izbrani na podlagi predhodnih eksperimentalnih rezultatov, saj so le iz teh dveh nastala nanovlakna pri vseh napetostih. Dobljene rezultate prikazujejo Grafa 5 in 6 ter Preglednici 13 in 14.

Analiza je pokazala, da je premer vlaken, izdelanih iz PEO višje molekulske mase, praviloma večji. Tako kot že v predhodnih rezultatih odstopanje opazimo le v primeru tvorbe gladkih vlaken, kjer se premer znatno poveča v primerjavi z vlakni, na katerih so prisotni vozli. Pri 4 % raztopini, kjer gladka vlakna nastanejo le iz PEO 900k pri napetosti 15 kV, lahko to opazimo kot bistveno izrazitejše povečanje premera v primerjavi z ostalimi napetostmi, saj se premer poveča skoraj za faktor 4. Nadalje smo ugotovili, da je premer pri 5 % koncentraciji pri 20 kV praktično enak pri obeh uporabljenih molekulskih masah, pri 25 kV pa je premer vlaken iz PEO 400k celo večji kot premer vlaken iz PEO 900k. Slednje pripisujemo, tako kot že v prejšnjih primerih, posledici spremembe morfologije vlaken. Sklepamo torej lahko, da višja molekulska masa polimera vodi do povečanja premera nanovlaken. Vzrok za to je najverjetneje dejstvo, da so pri višjih molekulskih masah polimerov prisotne daljše verige, ki so bolj prepletene, zaradi tega je raztopina bolj viskozna, kar se pri enakih pogojih odraža v

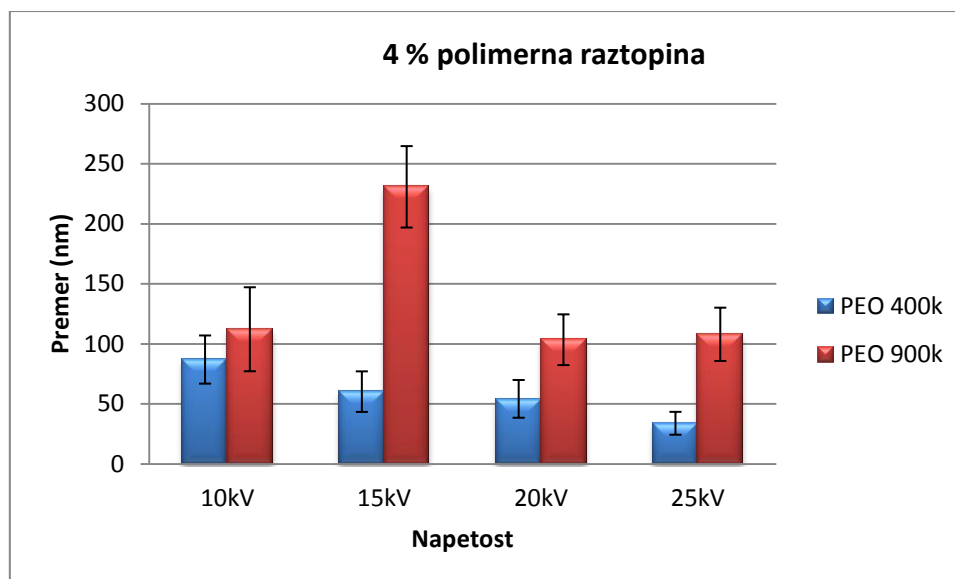
večjem premeru vlaken, saj zaradi večje viskoznosti elongacijske sile ne delujejo v tolikšni meri na curek. V primeru vozlov pa ni opaziti določenega vpliva molekulske mase na njihov premer.

**Preglednica 13:** Primerjava premerov vlaken in vozlov, izdelanih iz **4 %** polimernih raztopin **PEO 400k** in **PEO 900k** pri različnih napetostih.

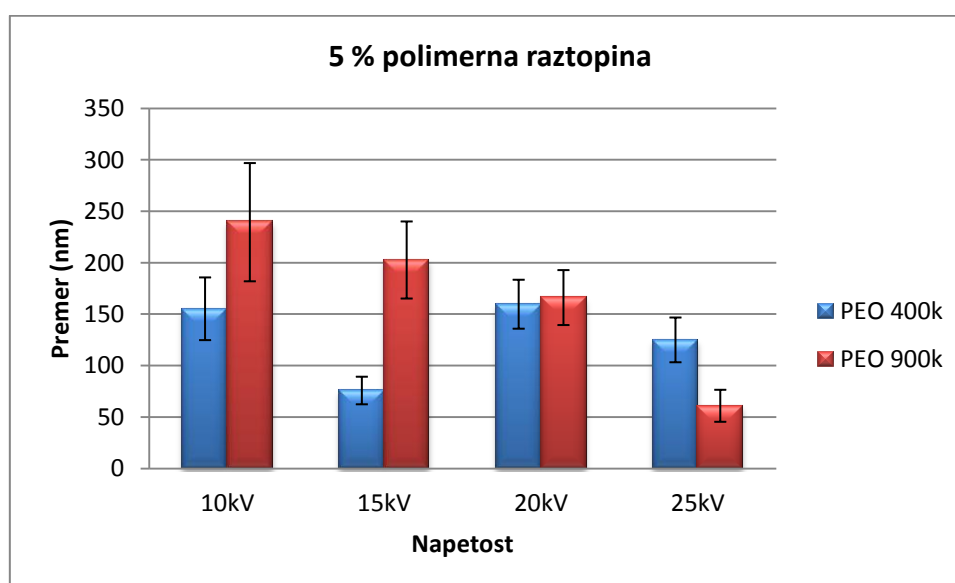
| Napetost (kV) | PEO 400k |       |        |        | PEO 900k |       |        |        |
|---------------|----------|-------|--------|--------|----------|-------|--------|--------|
|               | Vlakna   |       | Vozli  |        | vlakna   |       | vozli  |        |
| 10            | 86.93    | 20.06 | 972.06 | 295.07 | 112.17   | 34.99 | 875.42 | 151.67 |
| 15            | 60.2     | 16.9  | 787.76 | 210.66 | 230.81   | 33.92 | /      | /      |
| 20            | 54.18    | 15.72 | 922.65 | 286.12 | 103.45   | 21.15 | 553.14 | 76.41  |
| 25            | 33.82    | 9.55  | 333.34 | 131.31 | 107.94   | 22.2  | 497.08 | 104.23 |

**Preglednica 14:** Primerjava premerov vlaken in vozlov, izdelanih iz **5 %** polimernih raztopin **PEO 400k** in **PEO 900k** pri različnih napetostih.

| Napetost (kV) | PEO 400k |       |        |        | PEO 900k |       |        |        |
|---------------|----------|-------|--------|--------|----------|-------|--------|--------|
|               | Vlakna   |       | Vozli  |        | vlakna   |       | vozli  |        |
| 10            | 155.31   | 30.46 | 798.48 | 162.54 | 239.48   | 57.45 | 904.19 | 196.17 |
| 15            | 75.88    | 13.41 | 711.62 | 208.29 | 202.72   | 37.46 | 438.74 | 84.73  |
| 20            | 159.74   | 23.78 | /      | /      | 166.21   | 26.7  | 385.45 | 43.99  |
| 25            | 125.07   | 21.75 | /      | /      | 61.02    | 15.56 | 506.41 | 104.86 |



**Graf 5:** Primerjava premerov vlaken, izdelanih iz 4 % polimernih raztopin **PEO 400k** in **PEO 900k** pri različnih napetostih.



**Graf 6:** Primerjava premerov vlaken, izdelanih iz 5 % polimernih raztopin **PEO 400k** in **PEO 900k** pri različnih napetostih.

#### 4. 2. 4. Vpliv deleža dodanega hitosana

PEO smo se odločili kombinirati s hitosanom zaradi možnosti nadaljnje kemijske stabilizacije z glutaraldehydom. Za premreženje namreč potrebujemo stranske funkcionalne skupine na nanovlaknih in ker jih sam PEO v svoji strukturi nima, te zagotovi hitosan s stranskimi aminskimi skupinami.

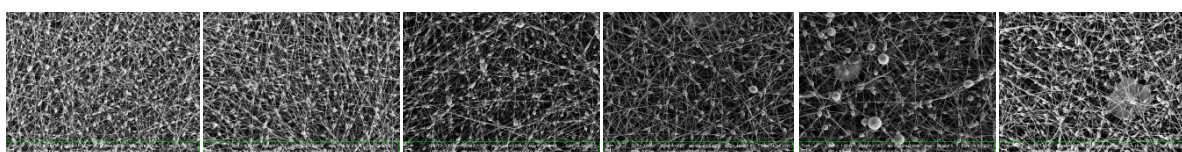
Na osnovi literaturnih podatkov smo za elektrostatsko sukanje izbrali raztopine PEO 400k in hitosana s celokupno koncentracijo polimerov 3 % (m/m) v različnih masnih razmerjih, in sicer PEO: hitosan = 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 93:7, 97:3. V vseh primerih je bila razdalja od kovinske igle do zbirala 17 cm, uporabljena napetost 20 kV, kot zbiralo pa smo uporabili mrežico Tegaderm<sup>®</sup>, pritrjeno na aluminijasto folijo z dvostranskim prevodnim lepilnim trakom.

Iz Slike 24 je razvidno, da v vseh primerih dobimo vlakna z vozlasto morfologijo, iz Preglednice 15 in Grafa 7 lahko ugotovimo, da premer vlaken enakomerno narašča z večanjem deleža PEO 400k. Tovrstna nanovlakna so izdelovali že v eni od prejšnjih diplomskih nalog, kjer pa so dobili gladka nanovlakna (34). Kasneje so ugotovili, da je na morfologijo v primeru PEO in hitosana vplivala relativna vlaga v komori, ki v času izvajanja te diplomske naloge ni bila nadzorovana. Ker smo v svoji diplomski nalogi želeli preizkusiti možnost kemijske stabilizacije nanovlaken, smo se zadovoljili tudi z nanovlakni z vozli, ki smo jih v nadaljevanju ovrednotili. Vlakna z največjim premerom smo dobili iz raztopine z najmanjšim deležom hitosana. Iz prejšnjih rezultatov vemo, da iz 3 % PEO nastanek nanovlaken ni mogoč, že manjši dodatek hitosana pa je spremenil lastnost raztopine, ki je omogočila pri elektrostatskem sukanju optimalnejše raztezanje verig ter s tem manjši premer nanovlaken. Slednje je lepo vidno tudi v primeru vozlov, saj se z večanjem deleža hitosana ti relativno manjšajo. To jasno nakazuje tudi na manjši vpliv površinske napetosti na tvorbo vozlov zaradi višje viskoznosti polimerne raztopine. Po drugi strani pa je zmanjšanje premera ob večanju deleža hitosana v raztopini v veliki meri tudi posledica kationske polielektrolitne narave hitosana. Dodatek hitosana znatno poveča prevodnost polimerne raztopine, posledično curek nosi večjo gostoto naboja, kar povzroči močnejše elektrostatske odbojne sile znotraj curka in vodi v nastanek vlaken manjšega premera. Na tem mestu velja omeniti, da je dobljeni rezultat elektrostatskega sukanja tako skupna posledica delovanja vseh sil znotraj curka.

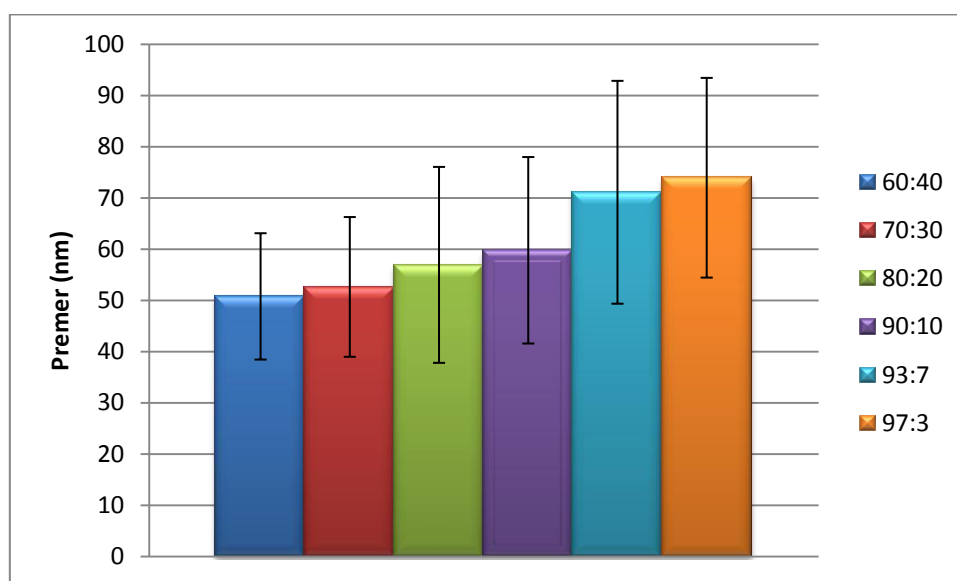


**Preglednica 15:** Premer vlaken in vozlov, izdelanih iz 3 % polimerne raztopine, mešanice **PEO 400k** in **hitosana** v različnih masnih razmerjih.

|        | Vlakna      |       | vozli       |        |
|--------|-------------|-------|-------------|--------|
| PEO:CH | Premer (nm) | SD    | Premer (nm) | SD     |
| 60:40  | 50.75       | 12.33 | 270.54      | 75.11  |
| 70:30  | 52.6        | 13.64 | 311.49      | 89.19  |
| 80:20  | 56.9        | 19.12 | 286.15      | 46.43  |
| 90:10  | 59.75       | 18.2  | 368.57      | 132.16 |
| 93:7   | 71.07       | 21.75 | 339.73      | 114.97 |
| 97:3   | 73.91       | 19.49 | 410.99      | 120.42 |



**Slika 24:** SEM slike vlaken in vozlov pri 10.000-kratni povečavi, izdelanih pri napetosti 20 kV iz polimerne raztopine **PEO 400k** in **hitosana** celokupne koncentracije 3 % z različnimi deleži hitosana - od leve proti desni, PEO:CH – 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 93:7, 97:3.



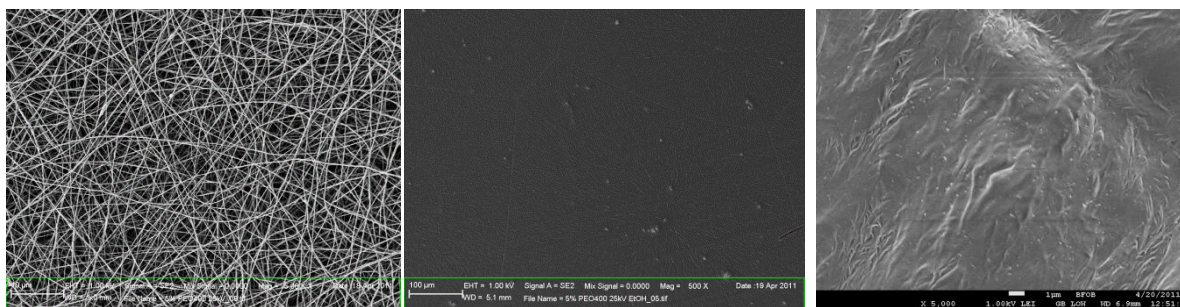
**Graf 7:** Premer vlaken, izdelanih iz 3 % polimerne raztopine, mešanice **PEO 400k** in **hitosana** v različnih masnih razmerjih.

### 4. 3. Stabilizacija izdelanih nanovlaken

Zaradi velikega potenciala nanovlaken za uporabo v biomedicinske namene, je ključnega pomena njihova obstojnost v fizioloških pogojih. V našem primeru smo te pogoje simulirali s pomočjo fosfatnega pufru, pH 7,4. Najprej smo preverili obstojnost nestabiliziranih nanovlaken iz PEO in PEO ter hitosana ter ugotovili, da so slednja v fizioloških pogojih popolnoma neobstoja, saj so se ob stiku s pufrom v trenutku raztopila. To pripisujemo dejstvu, da je PEO dobro topen v vodi, topnost pa je še dodatno izrazito povečana zaradi ogromne specifične površine nanovlaken. Problem stabilnosti nanovlaken smo v nadaljevanju poskušali rešiti z različnimi metodami za stabilizacijo vlaken.

#### 4. 3. 1. Stabilizacija z netopili

Kot že opisano v poglavju Postopki in metode smo nanovlakna poskusili stabilizirati z metodo netopil, saj naj bi slednja v strukturi nanovlaken omogočala več povezav med polimerom v vlaknih ter povečala stopnjo kristaliničnosti. V literaturi pogosto uporabljeni topili za to metodo stabilizacije sta metanol in etanol, zato smo ju uporabili tudi v našem primeru, čeprav je PEO pri povišanih temperaturah v njiju deloma topen. Po obdelavi z metanolom in etanolom pa se je izkazalo, da se nanovlakna po namakanju v pufru še vedno raztopijo - metoda stabilizacije v primeru PEO je bila torej neuspešna. To smo dokazali s tehtanjem vzorca pred in po stabilizaciji z netopili, kjer smo ugotovili, da se je masa zmanjšala. Dodatno smo uspešnost stabilizacije preverili z vrstičnim elektronskim mikroskopom, pri čemer so SEM slike potrdile, da po namakanju v etanolu oziroma metanolu in spiranju s pufrom na aluminijasti foliji ni več prisotnega vzorca, kar lahko vidimo na Sliki 25. Ker stabilizacija z metanolom in etanolom ni bila uspešna, smo metodo ponovili še z glicerolom in heksanom, v katerih je PEO netopen tudi pri povišanih temperaturah, vendar pa so bili rezultati tudi v tem primeru enaki – vzorec se je po obdelavi z netopiloma raztopil v pufru, ki smo ga uporabili za spiranje.



**Slika 25:** SEM slike vzorca vlaken, izdelanih iz 5 % polimerne raztopine **PEO 400k** pri **25 kV**, pred (levo) in po stabilizaciji z **etanolom** (sredina) in **metanolom** (desno) ter spiranjem s fosfatnim pufrom, pH 7,4. Povečava: **5.000 X**.

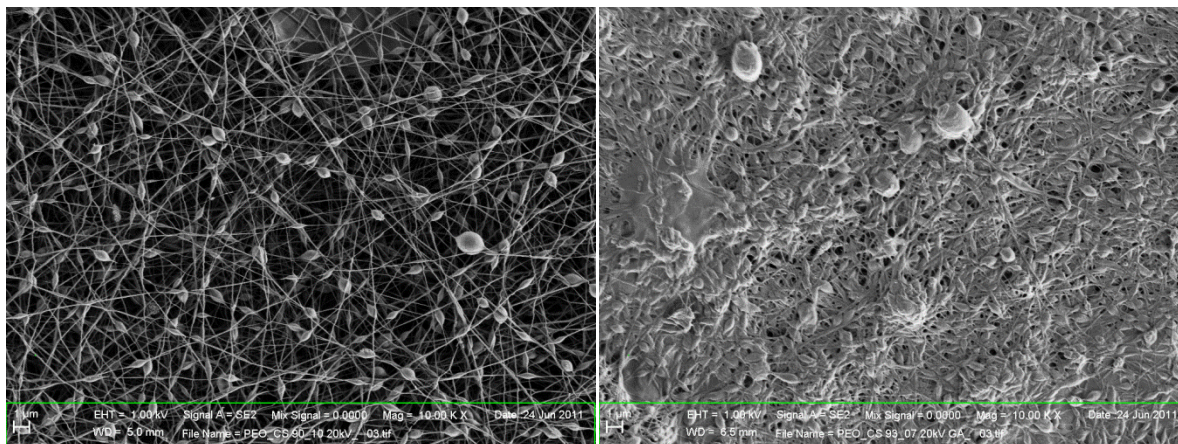
#### 4. 3. 2. Termična stabilizacija

Nadalje smo nanovlakna poskusili stabilizirati še z drugo metodo fizikalne stabilizacije, in sicer s termično obdelavo. Ta temelji na predvidevanju, da pri povišani temperaturi odstranimo zaostalo vodo znotraj prepleta nanovlaken, tako da se vodikove vezi med vodo in polimerom nadomestijo z intermolekularnimi vodikovimi vezmi med verigami samega polimera, s tem pa se poveča stabilnost nanovlaken. Vzorec z nanovlakni smo tako zavili v aluminijasto folijo in ga postavili v sušilnik z vročim zrakom za 20 minut pri temperaturi 160 °C, pri čemer so ti pogoji povzeti iz literature. Po ohladitvi smo preverili stanje vzorca ter ugotovili, da na koščku aluminijaste folije ni bilo več prisotnih nanovlaken. Naknadno smo preverili temperaturo tališča PEO in ker je ta okrog 65 °C, smo sklepali, da se je celoten vzorec stalil. Dokaz za to je bilo tudi zmanjšanje mase vzorca po stabilizaciji. Predvidevamo, da stabilizacija pri temperaturah primernih glede na tališče PEO, najverjetneje ne bi bila uspešna, saj so te prenizke, da bi dosegli odstranitev odvečne vode iz prepleta nanovlaken. Zaključimo torej lahko, da je tudi termična stabilizacija za PEO nanovlakna neuspešna.

#### 4. 3. 3. Stabilizacija z glutaraldehidom

Zaradi neuspešnosti fizikalnih metod smo v nadaljevanju poskusili še s kemijsko metodo stabilizacije - premreženjem z glutaraldehidom. V ta namen smo izdelali nanovlakna iz PEO v kombinaciji s hitosanom. Po izvedeni stabilizaciji in spiranju s prečiščeno vodo smo ugotovili, da je bila ta metoda stabilizacije uspešna. Stabilizirana nanovlakna se ob stiku z vodo in fosfatnim pufrom niso raztopila, že s prostim očesom pa se je dalo ugotoviti, da je vzorec ostal na mrežici. Kljub temu smo učinkovitost stabilizacije preverili še z elektronskim mikroskopom, kar je prikazano na Sliki 26. Na sliki je jasno vidna tvorba dodatnih stikov in sprememba strukture na obdelanih nanovlaknih v primerjavi z neobdelanimi. Pomembno pa

je, da je tudi po stabilizaciji z glutaraldehidom še vedno ohranjena vlaknasta struktura vzorcev.

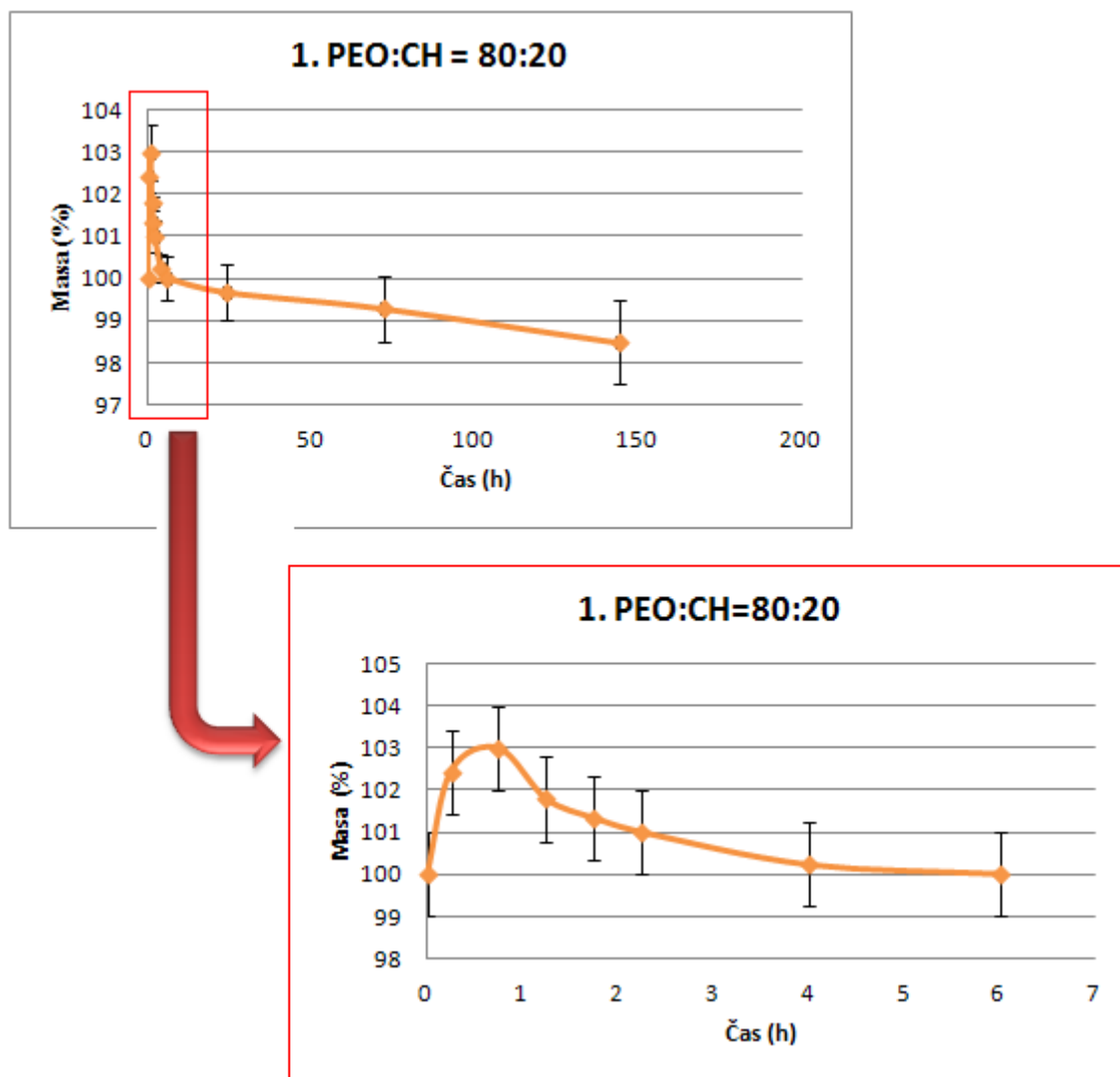


**Slika 26:** SEM slike vlaken, izdelanih pri napetosti **20 kV** iz **3 %** polimerne raztopine **PEO 400k** in **hitosana** v masnem razmerju **90:10**, pred (levo) in po (desno) stabilizaciji z **glutaraldehidom**. Povečava: **10.000 X**.

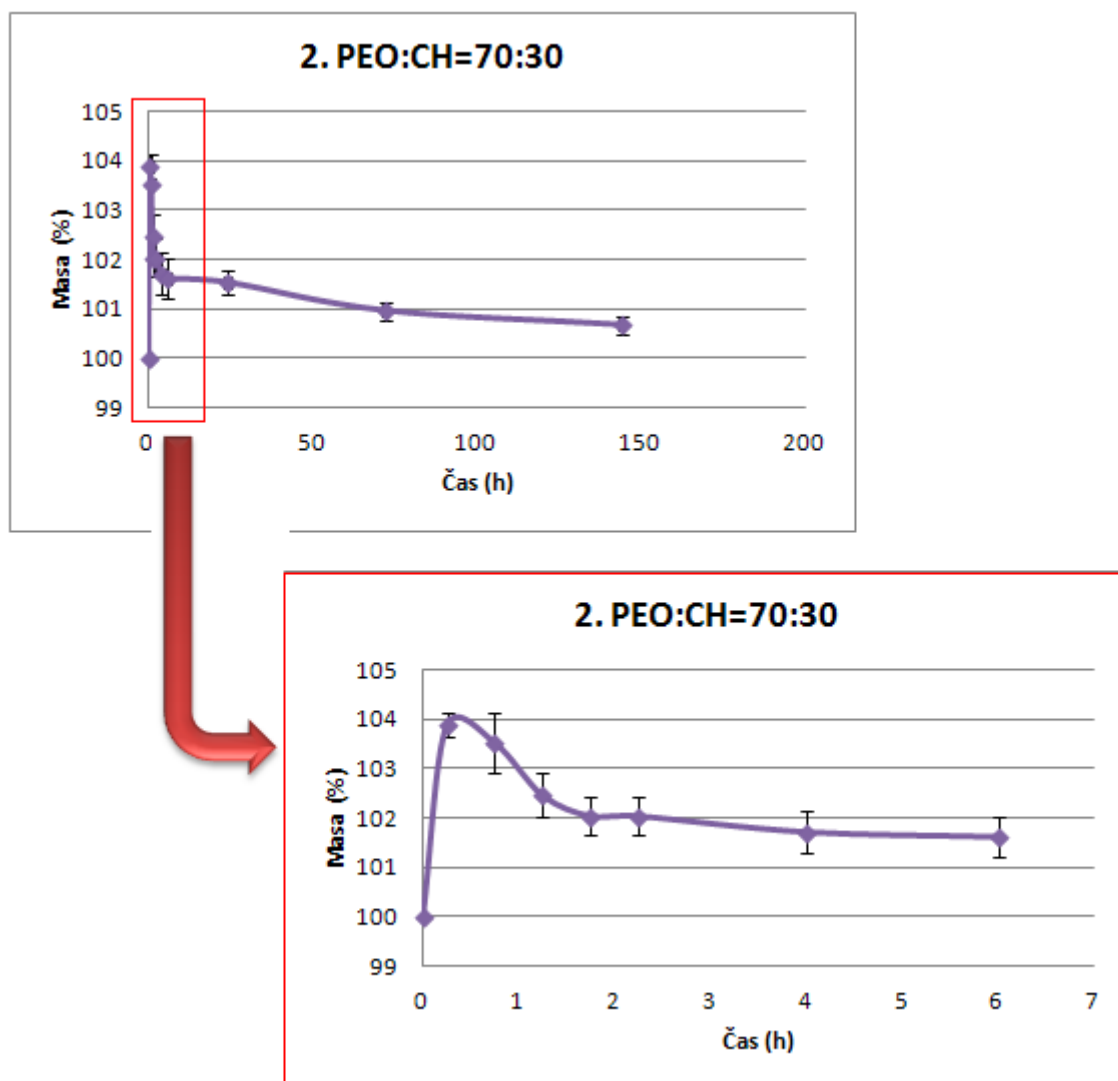
#### 4. 4. Stopnja in hitrost hidratacije stabiliziranih nanovlaken

Poleg stabilnosti nanovlaken je v preliminarjih študijah pomembno preučiti obnašanje nanovlaken v fiziološkem okolju. V ta namen smo spremljali stopnjo in hitrost hidratacije stabiliziranih vlaken v simuliranih fizioloških pogojih, ki smo jih posneli z uporabo fosfatnega pufra s pH 7,4.

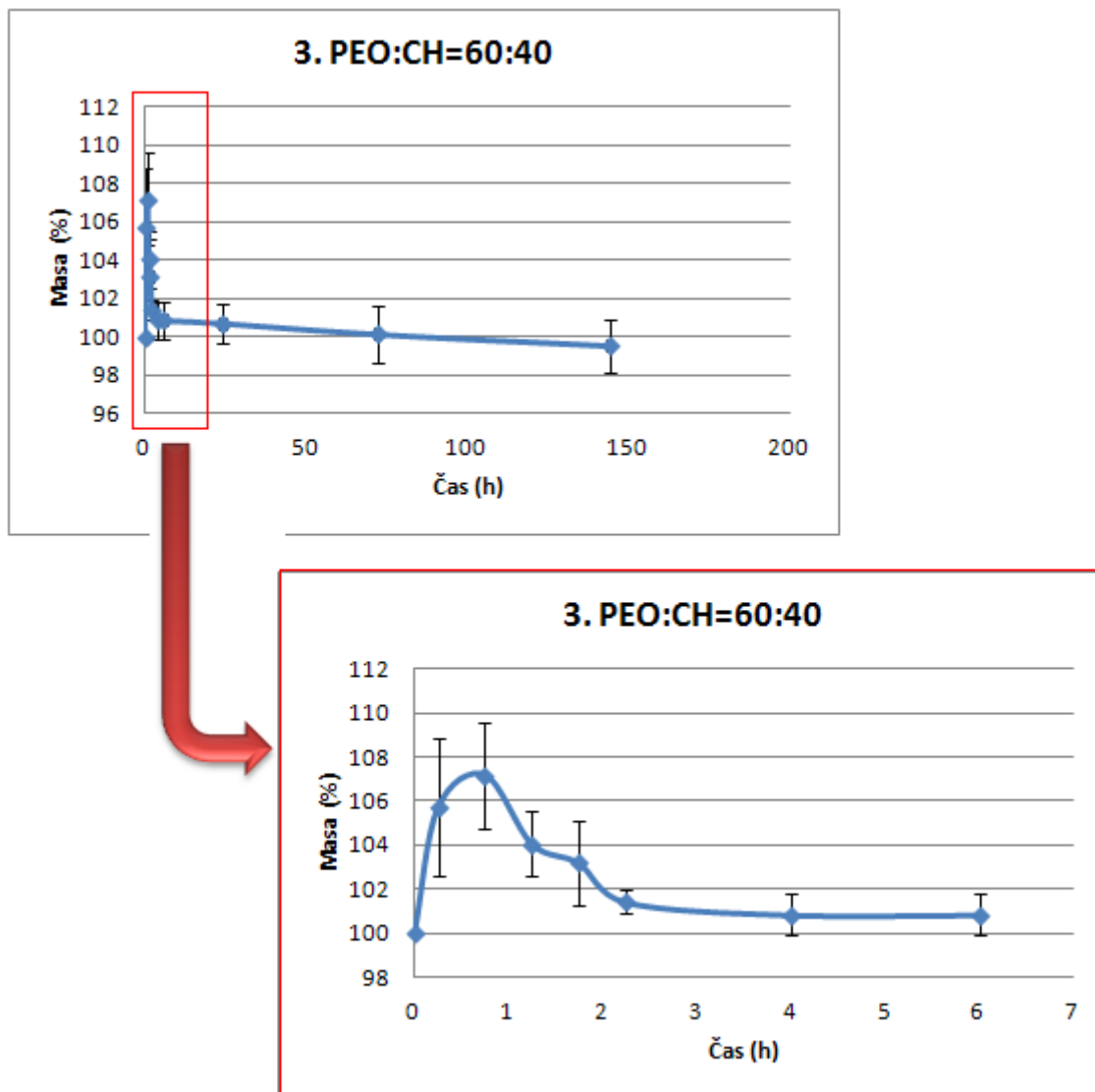
Za poskus smo uporabili tri vzorce nanovlaken, izdelanih iz polimernih raztopin PEO 400k in hitosana ter stabiliziranih z GA, za vsakega pa smo meritve izvajali v treh paralelkah. Rezultate smo podali v odstotkih spremembe mase glede na celotno maso vzorca v odvisnosti od časa. Pri tem smo zaradi lažjega rokovanja tehtali kar nanovlakna skupaj z mrežico Tegaderm<sup>®</sup>, saj bi odstranitev teh predstavljala preveliko izgubo. Poleg tega smo na ta način zmanjšali tudi vpliv napak pri tehtanju, saj so bile mase vzorcev nanovlaken izredno majhne (okrog 3-4 mg). Ne glede na to pa trdimo, da so rezultati relevantni, saj so razmerja sprememb mas ohranjena ne glede na to ali upoštevamo celotno maso z mrežico vred ali pa samo maso vlaken. Rezultati so prikazani v Grafih 8-10.



**Graf 8:** Sprememba mase v odstotkih v odvisnosti od časa, za vzorec **PEO:CH=80:20** čez celoten čas meritve (zgoraj) ter povečanih prvih 6 ur (spodaj).



**Graf 9:** Sprememba mase v odstotkih v odvisnosti od časa, za vzorec **PEO:CH=70:30** čez celoten čas meritve (zgoraj) ter povečanih **prvih 6 ur** (spodaj).



**Graf 10:** Sprememba mase v odstotkih v odvisnosti od časa, za vzorec **PEO:CH=60:40** čez celoten čas meritve (zgoraj) ter povečanih **prvih 6 ur** (spodaj).

Na grafih 8, 9 in 10 zasledimo enak trend pri vseh treh vzorcih, in sicer se masa do 1 ure najprej znatno poveča, nato začne hitro padati do približno dveh ur, kasneje pa se ustali ter se v nadaljevanju enakomerno, zelo počasi manjša. Začetni porast mase pripisujemo dejstvu, da se vzorec omoči ter zelo hitro hidratira, saj so nanovlakna izdelana iz hidrofilnega materiala ter imajo veliko specifično površino. Nadaljnji padec mase pa nakazuje, da nato nastopi erozija nanovlaken, odpletanje polimernih verig ter njihovo raztapljanje, ta proces pa je očitno počasen in prevladuje nad hidratacijo. Bistvenih razlik v trendu v prvih šestih urah med vzorci z različnim deležem hitosana ne opazimo, ugotovimo pa lahko, da poteka erozija po šestih urah nekoliko hitreje v primeru vzorcev z manjšim deležem hitosana. Omenjeni



rezultat je v skladu s pričakovanji, saj je z manjšim deležem hitosana v vzorcu na voljo manj funkcionalnih skupin za prečno premreženje, kar se odraža v nekoliko slabši obstojnosti vzorca na erozijo. Vsi vzorci pa so bili po 20 dneh, ko smo zaključili analizo, še vedno delno prisotni na mrežicah.

Določena odstopanja od trenda ter relativno velike standardne odmike meritev pripisujemo zlasti majhni količini vzorca in posledično majhni spremembi mase, nenatančnosti pri tehtanju ter slabi možnosti standardizacije metode. Na tem mestu velja omeniti, da smo v našem eksperimentalnem delu poskušali metodo v največji meri standardizirati tako, da smo vedno izvajali popolnoma enak postopek in vrstni red tehtanja ter odčitavanja mase. Za izboljšanje postopka merjenja in zmanjšanje eksperimentalnih napak, bi vsekakor potrebovali večje količine vzorca, vendar pa bi ob tem vzorec najverjetneje po določenem času odstopil in začel plavati v pufru, kar bi še povečalo problematičnost tehtanja. Ne glede na pomanjkljivost takšne metode spremljanja hidratacije, pa je le-ta tudi v literaturi najpogostejše uporabljena. Prav zaradi tega menimo, da bi bilo za natančnejše spremljanje obnašanja nanovlaken v fiziološkem okolju smiselno uporabiti metodo, ki omogoča analizo na nanometrskem nivoju, kot je na primer mikroskopija na atomsko silo (AFM).



## 5. SKLEP

V diplomski nalogi smo izdelali nanovlakna iz PEO s postopkom elektrostatskega sukanja ter proučevali vpliv posameznih spremenljivk na njihovo morfologijo. Kot topilo smo uporabili prečiščeno vodo. Nadalje smo nanovlakna stabilizirali za večjo obstojnost v fizioloških pogojih ter spremljali stopnjo in hitrost hidratacije vlaken v simuliranih fizioloških pogojih. Ugotovili smo, da so za tvorbo nanovlaken primerne le polimerne raztopine PEO 400k s koncentracijo 4 %, 5 % ter 6 % ter PEO 900k s koncentracijo 4 % in 5 %. Naštete imajo namreč primerno viskoznost in zadostno število prepletov polimernih verig, da omogočajo nastanek stabilnega neprekinjenega curka pri elektrostatskem sukanju.

Nadalje so rezultati pokazali, da so v večini primerov nastala nanovlakna z vozli, medtem ko smo gladka nanovlakna dobili le v primeru 5 % in 6 % polimerne raztopine PEO 400k pri napetostih 20 kV in 25 kV ter iz 4 % polimerne raztopine PEO 900k pri napetosti 15 kV. Premer vseh nanovlaken, tako gladkih kot tistih z vozli, je v razponu od 30 nm do 330 nm. Pri ugotavljanju vpliva uporabljene električne napetosti na premer in morfologijo vlaken smo ugotovili, da se premer vlaken z naraščanjem napetosti manjša, kar je v skladu z naraščanjem sil znotraj curka in z že objavljenimi rezultati. Vendar pa smo v naših rezultatih prvič dokazali, da ta trditev drži le v primerih, ko ne pride do spremembe morfologije nanovlaken.

Analiza vpliva koncentracije polimerne raztopine je pokazala, da se z višanjem koncentracije ne glede na uporabljeno napetost veča tudi premer vlaken, kar je posledica pogostejših prepletov med verigami in večjega masnega pretoka polimera. Dodatno smo ugotovili, da višja molekulska masa uporabljenega polimera pri isti koncentraciji vodi v nastanek nanovlaken z večjim premerom.

V nadaljevanju smo izdelali nanovlakna PEO v kombinaciji s hitosanom. Dodatek tega v polimerno raztopino precej poveča viskoznost in prevodnost polimerne raztopine, kar znatno vpliva na nastanek in morfologijo nanovlaken. Ugotovili smo, da so v vseh primerih še vedno prisotni vozli, kar je posledica nenadzorovane relativne vlažnosti v komori za elektrostatsko sukanje. Se pa z večjim deležem hitosana premer nanovlaken manjša. Za uporabo nanovlaken v biomedicinske namene je stabilizacija nanovlaken ključnega pomena. Ugotovili smo, da fizikalne metode stabilizacije, kot sta termična stabilizacija in stabilizacija z netopili, v primeru nanovlaken iz PEO niso uspešne. Ko smo PEO kombinirali s hitosanom, smo uspešno izvedli kemijsko stabilizacijo s prečnim premreženjem verig z glutaraldehidom.

Rezultati analize stopnje in hitrosti hidratacije so pokazali enak trend pri vseh stabiliziranih nanovlaknih ne glede na njihovo sestavo, to je hiter in velik porast mase v prvi uri ter nadaljnjo počasno erozijo preko obdobja 20 dni. Ne glede na to pa lahko zaključimo, da so stabilizirana nanovlakna zelo dobro obstojna v fizioloških pogojih in zato predstavljajo velik potencial za uporabo v biomedicinske namene.

Prišli smo tudi do zaključka, da je pomen temperature in vlažnosti veliko večji, kot se jima trenutno pripisuje po literaturi, zato je v nadaljnjih raziskavah smiselno podrobneje preučiti njun vpliv na proces elektrostatskega sukanja. Le s poznavanjem in razumevanjem vseh spremenljivk lahko namreč pričakujemo ponovljive rezultate in vnaprej načrtujemo želeno morfologijo nanovlaken.

## 6. LITERATURA

1. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim TC, Ma Z: ***An introduction to electrospinning and nanofibers***. World Scientific, New Jersey 2005
2. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S: ***A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites***. Composites Science and Technology 2003, 63: 2223-2253
3. Tan EPS, Ng SY, Lim CT: ***Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber***. Biomaterials 2005, 26: 1453-1456
4. Khil MS, Cha DI, Kim HY, Kim IS, Bhattarai N: ***Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing***. Journal of Biomedical Material Research 2003, 67B, pp. 675-679
5. Tsai pp, Schreuder-Gibson H, Gibson P: ***Different electrostatic methods for making electret filters***. Journal of Electrostatics 2002, 54, pp. 333-341
6. Smith WJ and Dunn MA: ***Medical defense against blistering chemical warfare agents***. Archives of Dermatology 1991, 127, 8, pp. 1207-1213
7. Bhardwaj N, Kundu SC. ***Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique***. Biotechnology Advances 2010, 28: 325-347
8. Sill TJ, Recum HAV. ***Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering***. Biomaterials 2008, 29: 1989-2006
9. Larrondo L, Manley RSJ: ***Electrostatic fiber spinning from polymer melts. 1. Experimental-observations on fiber formation and properties***. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 1981, 19(6):909-20
10. Larrondo L, Manley RSJ: ***Electrostatic fiber spinning from polymer melts. 2. Examination of the flow field in an electrically driven jet***. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 1981, 19(6):921-32
11. Annis D, Bornat A, Edwards RO, Higham A, Loveday B, Wilson J: ***An elastomeric vascular prosthesis***. American Society for Artificial Internal Organs 1978, 24:209-14

12. Son WK, Youk JH, Lee TS, Park WH: ***The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers***. Polymer 2004, 45/9: 2959-2966
13. Paipitak K, Pornpra T, Mongkontalang P, Techitdheera W, Pecharapa W: ***Characterization of PVA-Chitosan Nanofibers Prepared by Electrospinning***. Procedia Engineering 2011, 8: 101-105
14. Regev O, Vandebril S, Zussman E, Clasen C: ***The role of interfacial viscoelasticity in the stabilization of an electrospun jet***. Polymer 2010, 51: 2611-2620
15. Taylor G: ***Disintegration of water drops in an electric field***. Proceedings of the Royal Society A London 1964, 280: pp. 383-397
16. Zong XH, Kim KS, Fang DF, Ran SF, Hsiao BS, Chu B: ***Structure and process relationship of Electrospun bioabsorbable nanofiber membranes***. Polymer 2002, 43: pp. 4403-4412
17. Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Tan NCB: ***The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles***. Polymer 2001, 42: pp. 261-272
18. Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF: ***Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers***, Macromolecules 2002, 35: pp. 8456-8466
19. Pawlowski KJ, Belvin HL, Raney DL, Su J, Harrison JS, Siochi EJ: ***Electrospinning of a micro-air vehicle wing skin***. Polymer 2003, 44: pp. 1309-1314
20. Demir MM, Yilgor I, Yilgor E, Erman B: ***Electrospinning of polyurethane fibers***. Polymer 2002, 43: pp. 3303-3309
21. Zhao SL, Wu XH, Wang LG, Huang Y: ***Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions***. Journal of Applied Polymer Science 2004, 91: pp. 242-246
22. Krishnappa RVN, Desai K, Sung CM: ***Morphological study of electrospun polycarbonates as a function of the solvent and processing voltage***. Journal of Materials Science 2003, 38: pp. 2357-2365
23. Kessick R, Fenn J, Tepper G: ***The use of AC potentials in electrospraying and electrospinning processes***. Polymer 2004, 45: pp. 2981-2984

24. Baumgarten PK: ***Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers***. Journal of Colloid and Interface Science 1971, 36: pp. 75-79
25. ***Polyethylene Oxide***, Official Monographs, Pharmacopoeia Europea 5th Edition 2008, 2264-2265
26. <http://www.sigmaaldrich.com>
27. Stipanelov Vrandečić N, Erceg M, Jakić M, Klarić I: ***Kinetic analysis of thermal degradation of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene oxide)s of different molecular weight***. Thermochemica Acta 2010, 498: 71-80
28. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ: ***Handbook of pharmaceutical excipients, 4<sup>th</sup> Ed.***, APhA Publications 2003, 460-462
29. Erman A: ***Hitosan in možna uporaba v medicini***. Zdravniški Vestnik 2011, 80: 489-498
30. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E: ***Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications***. Progress in Polymer Science 2011, 36: 981-1014.
31. Khor E, Lim LY: ***Implantable applications of chitin and chitosan***. Biomaterials 2003, 24: 2339-2349
32. Homayoni H, Ravandi SAH, Valizadeh M: ***Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization***. Carbohydrate Polymers 2009, 77: 656-661
33. Humphrey HP Yiu: ***Engineering the multifunctional surface on magnetic nanoparticles for targeted biomedical applications: First coating layer on MNPs***. Nanomedicine 2011, 6(8):1429-1446
34. Fortuna A: ***Hitosanska nanovlakna: Izdelava, vrednotenje ter in vitro preverjanje celičnega odziva***. Diplomska naloga 2011
35. Gupta P, Elkins C, Long TE, Wilkes GL: ***Electrospinning of linear homopolymers of poly(methylmethacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent***. Polymer 2005;46:4799-810
36. Meechaisue C, Dubin R, Supaphol P, Hoven VP, Kohn J: ***Electrospun mat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use as tissue scaffolding material***. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2006, 17(9):1039-56