

Raport z wykonania projektu KBN nr N 508 031 31/1740

Optymalizacja procesu wytwarzania nanowłókien metodą elektroprzędzenia

Kierownik projektu

prof. dr hab. Tomasz A. Kowalewski



*Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN
ul. Pawińskiego 5 b, 02-106 Warszawa*

Wprowadzenie

Temat projektu wiąże się z wykorzystaniem metody elektroprzędzenia do efektywnego otrzymywania nanowłókien, tzn. rozciągania wybranego materiału o średnicy od kilku do kilkunastu nanometrów w polu elektrostatycznym. Nano-włókniny znajdują zastosowanie jako nano-filtry biologiczne, elementy nanoelektroniki, aktywne opatrunki, w systemach uwalniania leków, do tworzenia „nano-rusztowań” w inżynierii tkankowej (przyswajalne implanty, odbudowa skóry lub tkanek), a także do ubrań ochronnych zabezpieczające przed przenikaniem bakterii czy wirusów. Realizowany program badań procesu elektroprzędzenia obejmował badania podstawowe, prowadzące w oparciu o symulacje numeryczne i badania laboratoryjne do optymalizacji procesu elektroprzędzenia i zwiększenia jego wydajności. Przeprowadzone badania doprowadziły do zbudowania prototypu aparatury pozwalającej na kontrolowaną produkcję włókien o zadanych parametrach (skład chemiczny, porowatość, geometria i wymiar włókien w włókninie) i opracowanie szeregu metodologii nad wykorzystaniem nanowłókien w badaniach biomedycznych..

Niniejszy raport zawiera zbiór materiałów powstałych w trakcie realizacji badań związanych z optymalizacją procesu wytwarzania nanowłókien polimerowych metodą elektroprzędzenia. Badania przeprowadzono dla kilkunastu konfiguracji geometrycznych urządzenia wytwarzającego nanowłókna jak i dla kilkudziesięciu zmodyfikowanych składów fizyko-chemicznych użytego do tego procesu materiału. Pozwoliło to na znalezienie optymalnych „okien” procesu, umożliwiając wytwarzanie nanowłókien nie tylko dla klasycznych, znanych z literatury roztworów polimerowych, ale również dla materiałów biologicznych (białek), emulsji zawierających żywe komórki, włókien nierozpuszczalnych w wodzie, oraz cieczy prostych (gliceryna). Oryginalna modyfikacja procesu zbierania elektroprzędzonego materiału polimerowego umożliwiła opracowanie skutecznej metody wytwarzania z nanowłókniny nierozpuszczalnych w wodzie membran polimerowych (przygotowywane zgłoszenie patentowe). W trakcie realizacji głównego wątku projektu, autorzy starali się również zbadać, jakie są perspektywy wykorzystania wytwarzanej tą metodą włókniny w diagnostyce i terapii medycznej. Stwierdzono, że zarówno porowatość materiału nanowłókna jak i warunki, w jakich ten materiał powstaje mają istotny wpływ na proliferację hodowli komórkowych. Systematyczne badania mające na celu znalezienie optymalnych parametrów dla procesu wytwarzania biodegradowalnych, aktywnych opatrunków w zastosowaniach medycznych, jak i nad wykorzystaniem nanowłókien jako biosensorów do badań komórkowych są obecnie intensywnie kontynuowane.

Projekt zrealizowano w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki PAN w Zakładzie Mechaniki i Fizyki Płynów. Praca powstała w wyniku grupowego wkładu wielu autorów Zespołu. Niewątpliwym liderem projektu jest jego główny wykonawca dr inż. Tomasz Kowalczyk, z pasją realizujący większość merytorycznych elementów projektu, autor szeregu oryginalnych rozwiązań dotyczących składu roztworów polimerowych. Istotny wkład w prowadzone badania wnieśli dr. S. Barral, dr. S. Błoński, mgr. D. Lamparska, K. Zembrzycki, dr M. Kowalczyk i mgr. M. Kędziński. Projekt był realizowany przy współpracy z szeregiem osób z poza Zakładu, należy tu przede wszystkim wymienić grupę prof. L. Jareckiego (doc. P. Sajkiewicz, mgr. D. Kołbuk). Obok badań wykonanych w ZMiFP IPPT PAN, należy jednak wymienić ważnych współudziałowców spoza zakładu. Cenny

wkład w badania własności elektrycznych projekt zawdzięcza grupie doc. dr hab. D. Pijanowskiej z IBiB PAN oraz dr R. Fryczkowskiemu z ATH w Bielsku-Białej. Szereg badań nad zastosowaniami biologicznymi umożliwił udział w badaniach grupy prof. D. Elbauma z IF PAN, a w szczególności dr A. Nowickiej, jak również doc. B. Noszczyka z CKU i dr hab. T. Ciacha IChP PW. Większość zdjęć SEM zostało wykonanych w ZUK IMDiK PAN. Wieloletnia współpraca z prof. A. Boccacinim z Imperial College w Londynie przyczyniła się do rozwoju metodyki wykorzystywania nanowłókien do konstrukcji i stabilizacji modeli implantów kostnych opartych na opatentowanym materiale Bioglass. Cenna okazała się współpraca związana z hodowlą komórek i elektroprzędzenie rusztowań komórkowych prowadzona z dr A.L. Arraiza z Mondragon University (Hiszpania) i jego doktorantem mgr. C. Gomesem odbywającym trzymiesięczne praktyki w ZMiFP. Również w ramach odbywanych z ZMiFP praktyk studenckich opracowaniem pomiarów nad elektroprzędzeniem gliceryny i wydajnością procesu zajmował się student Uniwersytetu w Uppsala F. Edin.

Wymiernym rezultatem przeprowadzonych w ramach projektu badań jest obok kilku wariantów skonstruowanej i zainstalowanej zarówno w Zakładzie jak i we współpracujących jednostkach (IF PAN) aparatury przeznaczonej do wytwarzania nanowłókien metodą elektroprzędzenia, szereg prezentacji konferencyjnych i opublikowanych artykułów, których lista znajduje się poniżej. W dużej części załączone publikacje stanowią uzupełnienie materiału zawartego w raporcie.

Prace powstałe w wyniku realizacji projektu (załącznik):

- O. Bretcanu, S. K. Misra, D. M. Yunos, A. R. Boccaccini, I. Roy, T. Kowalczyk, S. Blonski, T. A. Kowalewski, Electrospun nanofibrous biodegradable polyester coatings on Bioglass-based glass-ceramics for tissue engineering, *Materials Chemistry and Physics* 118, 420-426, 2009.
- T.A. Kowalewski, S. Barral, T. Kowalczyk, Modeling Electrospinning of Nanofibers, in *Modelling Nanomaterials and Nanosystems*. R. Pyrz, J.C. Rauhe (Eds.), IUTAM Bookseries Vol. 13, Springer Science+Business Media B.V., 2009, pp. 279-292
- T.A. Kowalewski, S. Barral, Modelling Electrospinning of Nanofibres, *PAMM* vol. 9, 2009.
- B. H. Noszczyk, T. Kowalczyk, Z. Pojda, J. Kawiak, J. Jethon "A novel nanofibrous mesh electrospun from human albumin may be a promising scaffold for tissue engineering" 11-th Congress ESPRAS (European Society of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery), 20-26 Sept. 2009, Rhodes, Greece, str. 47
- T. Kowalczyk A. Nowicka, D. Elbaum, T.A. Kowalewski, Electrospinning of bovine serum albumin. Optimization and the use for production of biosensors, *Biomacromolecules* 9, pp. 2087-2090, 2008.
- D. Elbaum, A. Nowicka, T. Kowalczyk, T. A. Kowalewski, "Biologiczne zastosowania nanocząstek i nanostruktur", I Krajowa Konferencja Nano i Mikromechaniki, Krasiczyn, 8-10 lipca 2008, str. 19, Oficyna Wyd. Polit. Rzeszowskiej 2008.
- D. Kołbuk, P. Sajkiewicz, T.A. Kowalewski, „Optical investigations of structure of poly (caprolactone) nanofibers formed by electrospinning”, I Krajowa Konferencja Nano i Mikromechaniki, Krasiczyn, 8-10 lipca 2008, str. 107, Oficyna Wyd. Polit. Rzeszowskiej 2008.
- T. Kowalczyk, T. A. Kowalewski, A. Nowicka, D. Elbaum: „Optymalizacja procesu elektroprzędzenia materiałów do zastosowań biomedycznych”, I Kongres Mechaniki Polskiej, Warszawa, 28–31 sierpnia 2007 r, str. P1-P8, CD-ROM Politechnika Warszawska 2007.
- T. Kowalczyk, T.A. Kowalewski, S. Blonski, S.K. Misra, O. Bretcanu, D. M. Yunos, A.R. Boccaccini: „The Use of Electrospinning for Preparation of Biodegradable Polyester

Nanofibres Combined with Bioglass® for Tissue Engineering, Euromat 2007, European Congress and Exhibition on Advanced Materials and Processes. 10-13 Sept 2007, Nuernberg, Niemcy.

Inną formą upowszechniania rezultatów badań przeprowadzonych w ramach projektu były zaproszone seminaria w kraju i zagranicą:

- Tomasz Kowalewski, Nanowłókna otrzymywane metoda elektroprzędzenia, Instytut Chemii Fizycznej PAN, 2007
- Tomasz Kowalewski, „Mikro i nanoprzepływy w zastosowaniach biologicznych” Instytut Fizyki PAN, 2009
- Tomasz Kowalewski, Uniwersytet w Eindhoven (Prof. Steenhoven), Nanofluidics and nanofibres for biomedical applications, 2007
- Tomasz Kowalczyk: Elektroprzędzenie nanowłókien - wielki krok ku małemu światu -IF PAN/IBiB PAN, 2008
- Tomasz Kowalczyk, Otrzymywanie nanowłókien metoda elektroprzędzenia WChem PW 2009 (wykład w ramach PTCer)

1 Wstęp

Niniejszy rozdział zawiera przegląd literatury wykorzystanej przy planowaniu i realizacji projektu. Celem rozdziału jest krótka ilustracja stanu badań w chwili rozpoczynania pracy, a także zaobserwowane postępy innych ośrodków. Przegląd pozwala lepiej ocenić wyniki osiągnięte w trakcie projektu.

Elektroprzędzenie nanowłókien wiąże się ze zjawiskiem oddziaływania strugi cieczy z polem elektrycznym, obserwowanym już w XVII wieku [43], w początkach badań nad elektrycznością. Sam proces został opisany na początku XX wieku przez Formhalsa w patentach [37, 38]. Praktyczne zastosowanie elektroprzędzenia zostało zauważone dopiero pod koniec ubiegłego wieku i od tego czasu, z każdym rokiem ukazuje się coraz więcej publikacji na ten temat. Wiele prac odnosi się do samej techniki elektroprzędzenia i próbuje opisać samą charakterystykę zjawisk rządzących procesem elektroprzędzenia [109, 90, 89, 82, 84, 75, 49], zachowania strugi elektroprzędzonego polimeru [9, 78, 100], wpływem dodatku soli [4], zastosowaniem dodatkowych elektrod sterujących strugą [105], otrzymywaniem włókien porowatych i pomiarami wielkości nanoporów otrzymanych wewnątrz włókien [45, 23, 39]. Jednym z osiągnięć związanych z produkcją nanowłókien jest otrzymanie włókien o rozmiarze do 4 nm. Modelowanie numeryczne takich supercienkich włókien pozwoliło stwierdzić, że w przekroju poprzecznym takiego włókna znajduje się 7 upakowanych obok siebie łańcuchów polimeru.

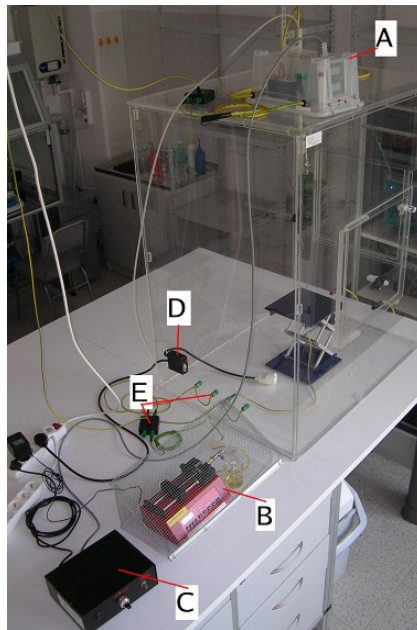
Jednym z poważniejszych problemów związanych z elektroprzędzeniem nanowłókien jest, często spotykana w przypadku nanomateriałów, wydajność procesu. Zastosowano wiele dysz, użyto porowatej rurki jako dyszy [33], albo całkowicie zrezygnowano z dysz. Zaburzenia powierzchni cieczy wywołane przez ciecze magnetoreologiczne, lub pęcherzyki gazu wprowadzonego pod powierzchnię cieczy, ruchome elementy również mogły zapoczątkować strumień elektroprzędzonej cieczy. Znane są również układy, w których zrezygnowano z targetu (elektroprzędzenie na powierzchnię wody) [92]. Wielu badaczy poświęca swoją uwagę uzyskaniu specyficznej architektury otrzymywanych nanowłókien: tworzono mikro rurki polimerowe [74] z zastosowaniem elektroprzędzenia ze współosiowych dysz [34, 116], lub z użyciem przewodzącego „wzorca” [115]. W publikacjach autorzy zajmują się również zastosowaniem punktów przecięcia nanowłókien wykonanych z różnych materiałów, jako sieci ultrananoreaktorów chemicznych [3], lub utworzeniem powierzchni superhydrofobowych [72]. Jednym z ważniejszych działów badań nad elektroprzędzonymi nanowłóknami jest ich zastosowanie do różnych działów biomedycyny [20, 66, 101, 2, 18]. W inżynierii tkankowej bardzo dużo uwagi poświęcono regeneracji kości z zastosowaniem kompozytów [65] z hydroksyapatytem [12, 47, 106], badano mineralizację rusztowań z chitozanu użytych do wypełniania ubytków kości [29, 104], wpływ rozmiaru elektroprzędzonych włókien użytych jako rusztowania na wzrost osteoblastów – komórek tworzących kości [4, 102], badano również zastosowanie kompozytów dekstranu i kopolimeru laktydy-*co*-glikolidu (PGLA) [82]. Wiele uwagi poświęcono również regeneracji skóry i opatrunkom na oparzenia: badano zachowanie komórek skóry na rusztowaniach z chityny [50], PGLA [8], PCL i kolagenu [103], oraz zastosowaniu kompozycji

modyfikowanego chitozanu jako opatrunków [24, 117]. Badano zastosowanie nanowłókien do regeneracji chrząstki stawowej [17], zastosowanie komórek macierzystych [48]. Badano również możliwość użycia nanowłókien do odbudowy tkanek przełyku [118], naczyń krwionośnych [97, 46], zastosowanie nanowłókien z kompozytów polimerów przewodzących i żelatyny do regeneracji komórek serca [62], hodowlę pępowinowych komórek progenitorowych na modyfikowanych powierzchniowo nanowłóknach [26]. Tworzono *in situ* implant z komórek mięśniowych przez elektroprzędzenie włókien rusztowania z jednej dyszy i jednoczesny elektrosprej zawiesiny komórek z drugiej dyszy [96]. Badano regenerację nerwów obwodowych z zastosowaniem rurek z PLGA [11], tworzenie sztucznej nerki z zastosowaniem układów mikrofluidycznych [61]. Ukazało się również wiele prac zajmujących się ogólnymi zasadami tworzenia rusztowań tkankowych z zastosowaniem nanowłókien [27, 28], rusztowań z białek [63], chitozanu [10], polistyrenu [6], kwasu hialuronowego [113]. W szeregu prac zajmowano się również degradacją *in vitro* i *in vivo* nanowłókien z PCL [16], biokompatybilnością *in vitro* włókien z PHBV [98], włóknami bioabsorbowanymi [91]. Badano rusztowania tkankowe wykonane z materiałów biozgodnych takich jak białka [35], kolagen [91], chitozan [32]. Przeprowadzono wiele badań nad zastosowaniem elektroprzędzonych nanowłókien jako systemów uwalniania leków [85], lub enzymów [114], heparyny [70] lub do dostarczania leków przez skórę [93]. Elektroprzędzone nanowłókna mogą być zastosowane jako sensory, np. wykonane z biodegradowalnych białek [52], jedwabiu [51], jako ważny z punktu widzenia zdrowia publicznego – potrzebny chorym na cukrzycę sensor poziomu glukozy zawierający oksydazę [88].

2 Stanowisko pomiarowe

Poniżej prezentowany jest opis stanowiska badawczego, wykonanego na potrzeby projektu zgodnie z planem przedstawionym w złożony wniosku o finansowanie badań. Stanowisko było wykorzystywane w badaniach nad procesem elektroprzędzenia. Miało ono kluczowe znaczenie dla wszystkich opisanych w dalszej części raportu prac.

Z wykorzystaniem zjawiska wirowania w polu elektrycznym strugi ciekłego materiału stanowisko badawcze służyło do tworzenia nanowłókien. Głównymi częściami stanowiska są: komora, zasilacz wysokiego napięcia, oświetlacz i pompa dozująca roztwór w procesie elektroprzędzenia. Składowe części stanowiska pokazano na Rys. 2-1. Zestaw pozwala na przeprowadzanie procesu elektroprzędzenia nanowłókien polimerowych w warunkach kontrolowania wybranych parametrów procesu, takich jak napięcie dyszy, odległość dyszy od targetu, napięcie targetu, wydatek roztworu polimeru oraz skład atmosfery, w jakiej odbywa się proces.



- A – Zasilacz HV
- B – Pompa strzykawkowa w ochronnej klatce
- C – Sterownik zasilacza HV
- D – Włącznik wewnętrznego gniazda 230V
- E – Gniazda uziemiające

Rys. 2-1 Składowe części stanowiska pomiarowego.

Komora

Umożliwia kontrolowanie wybranych warunków procesu elektroprzędzenia. Pełni również funkcje izolującą warunki zewnętrzne takie jak podmuchy powietrza. Wykonana z płyt pleksi o grubości 6mm, ma kształt prostopadłościanu o wymiarach 800x600x1000mm (szer. x gł. x wys.). Boczne ściany oraz płyta dolna są ze sobą trwale sklezione na całej długości łączącej. Płyta górna jest przykręcona do ścian śrubami. W ścianie przedniej wycięty jest kwadratowy otwór o wymiarach 350x350mm, przed którym zamontowano drzwiczki umożliwiające łatwy dostęp do wnętrza komory. Pośrodku płyty górnej zamontowana jest tuleja z PCV wraz ze śrubą blokującą, umożliwiającą montaż i regulację wysokości głowicy dozownika.

Gniazda uziemiające

W dolnej części lewej ściany zamontowane są cztery zielone gniazda bananowe umożliwiające łatwe podłączenie uziemienia do urządzeń i przedmiotów znajdujących się wewnątrz komory. Od strony zewnętrznej gniazda są podłączone do puszkii uziemiającej.

Parametry:

Średnica otworu: 4mm

Maksymalny prąd: 16A

Gniazdo zasilające

Umożliwia podłączenie zasilania do urządzeń znajdujących się we wnętrzu komory. Zamontowane jest na luźnym kablu wewnątrz komory. Kabel wyprowadzony jest poprzez lewą ścianę, w dolnej, tylnej części i wprowadzony do puszkii przykręconej do zewnętrznej strony ściany. Puszka wyposażona jest w wyłącznik oraz kontrolkę sygnalizującą. Do puszkii doprowadzony jest kabel zasilający zakończony wtyczką sieciową.

Parametry:

Maksymalny pobór prądu podłączonych urządzeń: 4A

Maksymalne napięcie zasilania: 230VAC

UWAGA, wyłącznik jest jednopunktowy, z czego wynika, że jego wyłączenie nie oznacza braku napięcia w gniazdku.

Gniazda dodatkowego zasilacza HV

Dwa gniazda bananowe, czarne i białe, znajdujące się w ścianie prawej w dolnej części. Umożliwiają podłączenie dodatkowego zasilacza wysokiego napięcia do przedmiotów znajdujących się wewnątrz komory. Od strony zewnętrznej na gniazda nasunięte są przewody wysokiego napięcia, które, w razie potrzeby, można zdjąć.

Parametry:

Maksymalny prąd gniazdek: 16A

Maksymalne napięcie kabli: 30kV

Zawór gazu/cieczy

Znajduje się nad przednim gniazdem dodatkowego zasilacza HV. Zakończony jest króćcami po obu stronach komory. Dzięki niemu można łatwo dostarczać gaz lub ciecz do wnętrza komory.

Dozownik hydrauliczny

Jest urządzeniem umożliwiającym precyzyjne kontrolowanie wydatku roztworu, jednocześnie zapewniając izolację użytkownika od wysokich napięć wewnątrz komory. Składa się z dwóch części połączonych twardym węzłem wykonanym z polietylenu, na którego końcach znajdują się identyczne strzykawki gazoszczelne z zaworkami trójdrożnymi. Wąż na długości 70mm zastąpiony jest uziemioną metalową rurką w celu zapewnienia dodatkowej ochrony przed wysokimi napięciami. W układzie zastosowano nieprzewodzący płyn hydrauliczny na bazie glikolu etylenowego. Wszystkie połączenia, zawory oraz tłoki dodatkowo uszczelniono smarem Apiezon L.

Podstawowe parametry układu:

Wąż:

marka: ROTH, Rotilabo, nr kat: 9585.1
 średnica wewnętrzna: 3mm
 grubość ścianki: 1mm
 materiał: Polietylen

Strzykawkę:

marka: Hamilton, nr kat. ROTH: X044.1
 materiał: cylinder szklany zakończony
 końcówką Luer-lock,
 tłok: aluminiowy pokryty teflonem
 pojemność: 10ml
 zawory: trójdrożne, zakończone końcówką
 Luer-Lock, nr kat. ROTH: P340.1
 płyn hydrauliczny: DOT-4



Rys. 2-2 Zdjęcie głowicy.

Pompa

Elektroniczna pompa strzykawkowa firmy „New Era Pump Systems”, model NE-1000. Umieszczona w uziemionej, metalowej klatce, w celu ochrony elektroniki od ładunków elektrostatycznych. Dodatkowo odbudowa pompy również uziemiona.

Głowica

Składa się z aluminiowego stelaża utrzymującego strzykawkę, przykręconego do rurki wykonanej z PCV (Rys. 2-2). Wężę hydrauliczne oraz przewody wysokiego napięcia prowadzone wewnątrz rury i wyprowadzone przez odpowiednie otwory. W dolnej części stelaża znajduje się mocowanie jednorazowych strzykawk z roztworem oraz z drugiej strony, mocowanie wyjścia kabla wysokiego napięcia. Strzykawkę montuje się poprzez odchylenie w lewą stronę profilu i umieszczeniu strzykawkę w otworze. Należy upewnić się czy tłok strzykawkę pompującej jest wystarczająco wysoko, aby zmieściła się strzykawkę a roztworem. Głowica przystosowana jest do dozowania strzykawkami firmy Braun, Injet-F o pojemności 1ml, nr kat. ROTH: T987.1. Są to strzykawkę całkowicie plastikowe, dzięki czemu można dozować roztwory zawierające substancje rozpuszczające lub spęczniające gumowe uszczelki.

Doprowadzenie wysokiego napięcia

Zasilacz wysokiego napięcia podłącza się do kabla wyprowadzonego z rurki PCV głowicy, a przeciwny biegun zasilacza należy podłączyć do uziemienia. Od strony wnętrza komory kabel przymocowany jest do stelaża aluminiowymi klamrami. Jego wyjście łączy się z dyszą strzykawkę za pomocą cienkiego, posrebrzonego drutu, zakończonego pętlą. Sposób mocowania drutu pozwala na jego łatwą wymianę w przypadku jego zużycia lub zabrudzenia.

Maksymalne napięcie: 30kV

Odpowietrzanie

Do odpowietrzania układu hydraulicznego służą zaworki trójdrożne przymocowane do obu strzykawkę dozownika. Brak powietrza jest konieczny do precyzyjnego działania dozownika. W celu odpowietrzania układu, do wolnych króćców obydwu zaworków należy przymocować węże. Koniec jednego węża należy zanurzyć w płynie hydraulicznym, natomiast koniec drugiego umieścić w pustej zlewce. Wykorzystując strzykawkę jako pompę oraz przez odpowiednią manipulację zaworkami, należy przetłaczać płyn, dopóki w układzie nie będzie powietrza.

Zasilacz wysokiego napięcia

Generator jest źródłem wysokiego napięcia stałego w zakresie od 0 do 30kV, z możliwością stabilizacji ustawionej wartości napięcia lub prądu. Dodatkowo istnieje możliwość modulacji napięcia z zewnętrznego źródła napięcia wolnozmiennego.

Generator stanowi zestaw dwu przyrządów połączonych kablem wielożyłowym.

Pierwszy to zasilacz sieciowy z pokrętkiem regulacji wysokiego napięcia lub prądu i gniazdem do modulacji zewnętrznej.

Drugi to właściwy generator wysokiego napięcia umieszczony w izolowanej obudowie polietylenowej. Na płycie bocznej generatora umieszczono wskaźniki cyfrowe: wysokiego napięcia [kV] i prądu [mikro- i nano-A]. Pod wskaźnikami znajdują się dwa przełączniki błyskawiczne:

Przełącznik po lewej stronie (dwa położenia) umożliwiają ustawienie właściwego zakresu pomiaru prądu (2000nA lub 2000uA).

Przełącznik po prawej stronie (trzy położenia) umożliwiają ustawienie zadanego reżimu pracy generatora:

Górna pozycja (U): oznacza prace ze stabilizacją napięcia.

Środkowa pozycja: oznacza prace bez stabilizacji. Pozycja ta jest zalecana przy modulacji zewnętrznej

Dolna pozycja: (I): oznacz prace ze stabilizacją prądu.

Dodatkowo obok wskaźników cyfrowych umieszczono czerwoną diodę sygnalizującą występowanie na wyjściu wysokiego napięcia, zgaśnięcie diody oznacza brak wysokiego napięcia.

UWAGA! Nie należy przełączać przełącznika rodzaju pracy (po prawej stronie) podczas występowania wysokiego napięcia. Przed zmianą rodzaju pracy należy bezwzględnie wyłączyć wysokie napięcie (do zgaśnięcia diody).

Przed wyłączeniem zasilacza z sieci należy również wyłączyć wysokie napięcie.

Oświetlacz

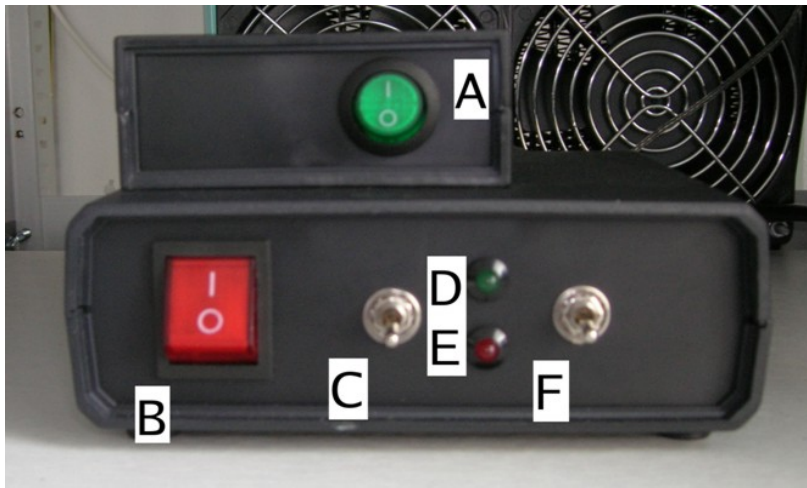
Służy do oświetlania procesu elektroprzemyślenia silnym strumieniem światła, co ułatwia obserwacje. Składa się z kilku modułów, umieszczonych na mobilnej szafie laboratoryjnej. Dodatkowo przed lampą umieszczony jest filtr wodny odcinający podczerwoną część widma lampy.

Regulacja światła w pionie odbywa się poprzez poluzowanie śruby blokującej za pomocą pokrętki umieszczonego na ramie reflektora, odpowiednie ustawienie i ponowne przykręcenie śruby.

Regulacja pozioma odbywa się przez przesunięcie całej szafy.

Lampa ze sterownikiem

Oświetlenie nanowłókien w procesie elektroprzędzenia stanowi trudny problem. Z uwagi na to, że średnica włókna jest porównywalna lub mniejsza od długości fali światła widzialnego, widoczne są jedynie refleksy światła na jego powierzchni. Tego typu oświetlenie wymaga dużej intensywności światła i wymagało skonstruowania specjalnego układu wyposażonego w reflektor sceniczny PAR64 o mocy 1kW, z soczewką skupiającą, cieczowym filtrem termicznym i systemem chłodzenia tej cieczy. Lampa została podłączona do elektronicznego sterownika, umożliwiającego włączanie i wyłączenie reflektora oraz włączenie z ograniczoną mocą. Sterownik wyposażony jest w czujnik temperatury cieczy znajdującej się w filtrze i w przypadku przegrzania samoczynnie wyłączy lampę uniemożliwiając jej ponowne uruchomienie do momentu schłodzenia cieczy.



- A – Włącznik wentylatorów chłodnicy
- B – Włącznik główny sterownika
- C – Włącznik lampy
- D – Dioda sygnalizująca włączenie lampy
- E – Dioda sygnalizująca przegrzanie
- F – Wybór mocy lampy

Rys. 2-3 Zdjęcie sterownika lampy oświetlającej.

Filtr

Filtr cieplny składa się ze szklanej komory wypełnionej płynem chodząco – filtrującym. Przednia i tylna ściana wykonana jest ze szkła hartowanego, ściany boczne i dolna ze zwykłego szkła, natomiast ściana górna z aluminiowej płyty z zamontowanymi dwoma króćcami oraz czujnikiem. Zamontowanie króćców, odprowadzającego i doprowadzającego płyn, na górze filtra zapewnia automatyczne odpowietrzanie. Światło przebywa w filtrze drogą około 2cm, pozwala to na odfiltrowanie większości promieniowania podczerwonego.

Stosowany płyn: Płyn chłodniczy Petrygo firmy Orlen

Pompa

Obieg cieczy w układzie wymuszany jest za pomocą pompy perystaltycznej.

Typ pompy: Elpan typ 372.1

Obroty: Nastaw maksymalny.

Chłodnica

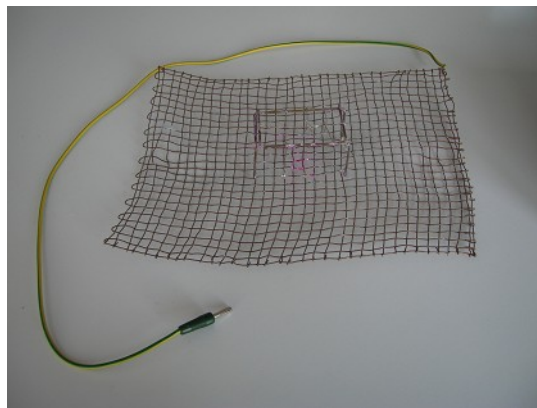
Zastosowano żebrowaną chłodnicę o wymiarach 24x24cm, wykonaną z mosiądzu, z zamontowanymi czterema wentylatorami zasilanymi z sieci 230V.

Akcesoria

Akcesoria służą do ustawiania parametrów układu jak również do utrzymywania włókien w określony sposób.

Standardowy target

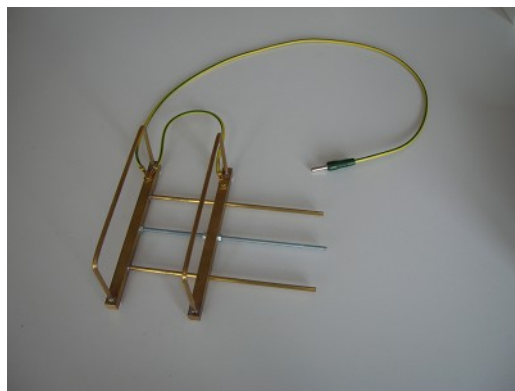
Składa się plecionki wykonanej z miedzianego drutu z podłączonym przewodem uziemiającym. Zapewnia dobre uziemienie, dobry do wstępnych eksperymentów, umożliwia otrzymanie krótkich odcinków włókien równoległych.



Rys. 2-4 Standardowy target.

Target do otrzymywania włókien ułożonych równolegle do siebie

Składa się z dwóch równoległych prętów wykonanych z mosiądzu. Pręty przymocowane są do mosiężnych podstaw, między którymi odległość można regulować. W czasie procesu ładujące włókna układają się między dwoma prętami, równoległe względem siebie.



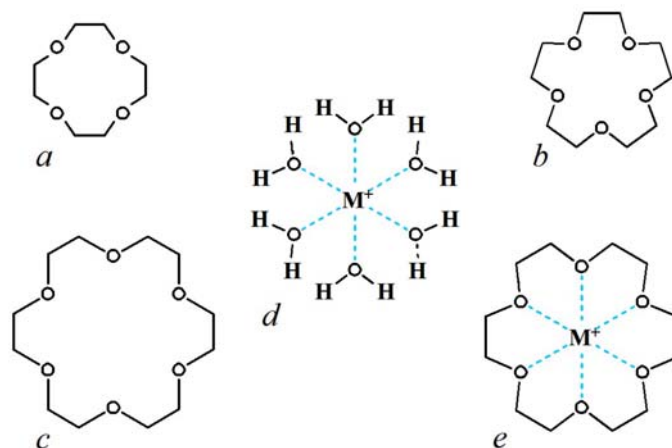
Rys. 2-5 Target do otrzymywania włókien równoległych.

3 Analiza własności elektrycznych włókien

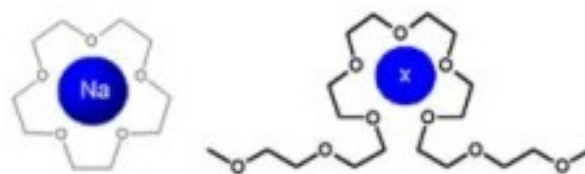
Poniżej opisano wyniki z realizacji jednego z zadań projektu, którego celem było zbadanie wpływu dodatków soli do roztworu wykorzystywanego przy otrzymywaniu nanowłókien w procesie elektroprzędzenia, a także zbadanie pojawiającej się w nanowłóknach porowatości. Przedmiotem rozważań były różne sole (np. NaCl, Na₂SO₄, NaOTs, NH₄Cl i inne) zmieniające właściwości cieczy i obserwacja elektroprzędzenia, a także porównywanie istotnych cech otrzymanych nanowłókien. Głównym efektem tych badań jest spostrzeżenie, że choć przebieg procesu różni się w szczegółach w zależności od użytej soli, to jednak jego wpływ na końcowy produkt jest niezależny od użytego kationu i anionu. Opis poniżej prezentuje szczegółowo motywację, sposób przeprowadzenia badań, obserwowane istotne cechy procesów i strukturę uzyskanych produktów.

3.1 Motywacja badań przeprowadzonych na przykładzie poli(tlenku etylenu)

Wykonując badania elektroprzędzenia z użyciem poli(tlenku etylenu) z dodatkiem różnych soli starano się odpowiedzieć na pytanie, jaki jest wpływ przewodnictwa elektrycznego cieczy na proces elektroprzędzenia? By odpowiedzieć na postawione pytanie na podstawie literatury przeanalizowano wpływ dodatku soli na proces elektroprzędzenia.



Rys. 3-1 Etery koronowe: a)12-korona-4, b)15-korona-5, c)18-korona-6 [122]
Kompleksy metali: d) z wodą, e) z eterem koronowym [123].



Rys. 3-2 Związki kompleksowe: a) jonu metalu i eteru koronowego, b) jonu metalu i dieteru metyłowego oligomeru poli (oksyetylenu). „Glym” zachowuje się jak „liniowy eter koronowy” [125]. Połączenia eterów koronowych są znacznie bardziej mobilne (18-korona-6-K⁺ pK=6,1, pentaglyme-K⁺ pK=2, 1 w metanolu [120]).

Mimo dużego zainteresowania problematyką elektroprzewodzenia (w ostatnich latach kilkadziesiąt publikacji rocznie) istniejący stan wiedzy jest nadal bardzo płytki. Zachowanie powszechnie badanych wodno-organicznych roztworów PEO nie jest do końca wyjaśnione. Układy typu PEO-sól, zawierające znaczne stężenia soli, często w ściśle bezwodnych warunkach są bardzo intensywnie badane z uwagi na ich zastosowanie jako stałych elektrolitów w bateriach litowo-polimerowych. Istnieje bogata literatura dotycząca oddziaływań PEO z solami, głównie litowymi.

Znacznie słabiej zbadane są układy typu wodno-organiczny roztwór PEO z niewielkim dodatkiem soli. Dostrzeżono zauważalny wpływ jonów K^+ lub Li^+ na zachowanie PEO rozpuszczonego w metanolu [79, 7], ale brak takiego wpływu w przypadku roztworu czysto wodnego [68]. Wskazano [60] również silny wpływ dodanego rozpuszczalnika organicznego na Ułożenie łańcucha polimeru w różne kształty w przestrzeni (konformację makrocząsteczki) PEO w roztworze wodnym. Zaobserwowana ekspansja łańcucha polimerowego dla układu rozpuszczalników była większa niż dla każdego rozpuszczalnika użytego osobno. Stwierdzono, że sposób odwracalnego tworzenia wiązania koordynacyjnego pomiędzy jonem metalu a atomami tlenu w poli(tlenku etylenu) (kompleksowania) niewielkich ilości soli zmienia się w zależności od zawartości wody w układzie rozpuszczalników.

Dodatek soli odgrywa znaczącą rolę w procesie elektroprzewodzenia oraz wpływa na właściwości otrzymanego materiału. Istnieje pewne stężenie NaCl optymalne dla stacjonarnego otrzymania supercienkich włókien. W przypadku PEO nie występuje zjawisko „wypacania” roztworu soli na powierzchnię włókna. Zjawisko to, zachodzi dla poli(laktydu), i prowadzi do utworzenia kryształów soli widocznych na powierzchni włókna. Zarówno dla NaCl jak i dla innych soli jest możliwie rozmijanie się optymalnych zakresów stężeń dla elektroprzewodzenia i dla właściwości uzyskanego materiału. W pracy [25] stwierdzono nieco szybszą biodegradację włókniny elektroprzewodzonej z dodatkiem niewielkiej ilości elektrolitu w porównaniu z włókniną otrzymaną z roztworu bez takiego dodatku. Autorzy pracy postawili hipotezę, że wpływ na to mogło mieć rozwinięcie powierzchni polimeru, „nanoporowatości”. Stwierdzono również korzystny wpływ dodatku organicznego elektrolitu na elektroprzewodzenie polimerów nierozpuszczalnych w wodzie.

Przegląd literatury nasuwa wniosek, że nie przebadano szeregu istotnych problemów. W związku z tym postanowiono skupić uwagę na badaniach z zastosowaniem poli(tlenku etylenu) - PEO i określeniu fundamentalnych zależności na wzorcowym polimerze.

Struga roztworu polimeru podczas elektroprzewodzenia zachowuje się jak izolator. Wpływ swobodnych jonów i elektronów w polu elektrycznym na ruch strugi nie jest do końca wyjaśniony. W badaniach proponuje się analizę tego efektu przez dodanie elektrolitu do roztworu, co spowoduje duży wzrost przewodnictwa elektrycznego roztworu w procesie elektroprzewodzenia. Może mieć również duży wpływ na cechy produktu końcowego. Aktualny stan wiedzy wskazuje, że dodatek soli może być kluczowym parametrem elektroprzewodzenia. Plan doświadczeń obejmuje badanie wpływu różnych soli na proces elektroprzewodzenia roztworów PEO. Badano wpływ soli zawierających kationy litowców, ponieważ kationy te mogą tworzyć kompleksy z łańcuchem polimeru. Jako najbardziej istotne zbadano wpływ soli zawierających kationy Li^+ , Na^+ i dla porównania niekompleksujący kation NH_4^+ . Użyto również zestawu soli sodowych zawierających różne aniony. Badania roztworów zawierających sole litu są szczególnie interesujące z praktycznego punktu widzenia, ponieważ sole te są stosowane w powszechnie używanych bateriach litowo-polimerowych, zawierających PEO.

Charakter kompleksowania jonów przez PEO może zmieniać się w zależności od stężenia rozpuszczalnika organicznego w roztworze. Zbadano wpływ stężenia etanolu w roztworze na proces elektroprzędzenia. Zbadano roztwory etanolowo-wodne, a następnie roztwory w czystym metanolu, PEO ani sole nie rozpuszczają się w czystym etanolu, co więcej wiele publikacji wskazywało na wystąpienie efektów kompleksowania jonów soli przez łańcuch PEO w roztworze metanolem, co mogło mieć wpływ na obserwowany wynik elektroprzędzenia.

Jako temat badań wybrano próbę usystematyzowania danych dotyczących wpływu dodatku elektrolitu na proces elektroprzędzenia. Jako modelowy polimer wybrano poli(tlenek etylenu) -PEO i jako elektrolity – sole litowców. PEO jest bardzo dobrze zbadany pod kątem procesu elektroprzędzenia i jest doskonałym polimerem modelowym. Nie bez znaczenia jest również fakt pozytywnych wyników elektroprzędzenia tego polimeru w Zakładzie. Przegląd literatury pokazuje kilka badań systematycznych, ale zazwyczaj jest to dodatek NaCl, czasami KBr, znane są również opracowania, gdzie autorzy używali elektrolitu nie jako dodatku poprawiającego proces elektroprzędzenia, ale jako dodatku wprowadzanego podczas przygotowania roztworu polimeru (kw. octowy-chitozan, KSCN-celuloza), istnieją również opracowania, gdzie autorzy bazowali na elektrolitowych zanieczyszczeniach przenoszących ładunek, co wprowadzało pewien element przypadkowości. Nie jest jasne czy i jak kationy elektrolitu mają tworzyć związki kompleksowe z matrycą polimerową, częste użycie soli litowców sugeruje, że do takiego kompleksowania powinno dochodzić i że po przekroczeniu pewnej, granicznej ilości elektrolitu właściwości przedne ulegają pogorszeniu. Badania przeprowadzone dla poli(alkoholu winylowego) sugerują, że zmiany konformacji łańcucha mogą utrudniać proces elektroprzędzenia, i że kationy o małym promieniu jonowym mogą destabilizować strugę. PEO naśladuje strukturę eteru koronowego kompleksując się z jonami litowców. Różne jony kompleksują się w różny sposób, również przeciwjon może mieć wielkie znaczenie. Najczęściej używane były sole zawierające aniony chlorowców, zwłaszcza chlorki i bromki, istnieją doniesienia o użyciu soli anionów organicznych.

3.2 Część doświadczalna

3.2.1 Metodyka badań

Podczas badań analizowano dwa typy roztworów soli i PEO: etanol/woda oraz metanol. Różnią się one pod względem możliwości kompleksowania jonów z łańcuchem polimeru i dlatego przedmiotem odrębnie prowadzonych badań były także różne kombinacje kationów, anionów i stężeń soli. Ze względu na cechy fizyko-chemiczne badania pierwszego rodzaju roztworów przeprowadzono na większą skalę. Roztwory w metanolu drastycznie słabiej przewodzą prąd. Zbadano dla roztworów soli przebieg procesu elektroprzędzenia badając wpływ zmiany przewodnictwa elektrycznego (S), potencjału elektrycznego (E), prądu (I) na długość odcinka prostego (L) i kąt rozwarcia stożka (A) tworzonego przez wirującą strugę materiału. W Tabeli 3-5 zebrano rezultaty tych pomiarów wykonanych dla sześciu różnych soli i porównano z układem bez dodatku soli. Część z tych badań porównano z modelem numerycznym, zmieniając w nim odpowiednio stałą opisującą gęstość ładunków elektrycznych w strudze.

3.2.2 Badania wpływu soli na przewodność

Przeprowadzono jednopunktowe pomiary przewodnictwa wodnych roztworów soli oraz wodno-etanolowych roztworów soli z użyciem konduktometru (typ CC 401 firmy Elmetron), wyposażonego w szklaną elektrodę pokrytą czernią platynową. Pomiary wykonywano przy pomocy konduktometru, w temperaturze 25°C po uprzednim wytermostatowaniu próbek. Dla stwierdzenia efektów histerezy próbki wykonywano pomiary, co 30 s.

Przeprowadzono pomiary przewodności roztworów różnych soli w zależności od jej rodzaju i stężenia w roztworze, przy ewentualnym dodatku polimeru. W szczególności badano przewodność dla:

- roztworów soli w wodzie i w 40% roztworze wodnym etanolu,
- roztworów PEO z dodatkiem NaCl (w 40% etanolu i w H₂O) i z dodatkiem NH₄Cl w 40% etanolu

Badane roztwory soli w wodzie destylowanej oraz w 40% etanolu nazywane są dalej etanolowymi. Wśród badanych ujęto toluenosulfonian sodu (skrót NaOTs), czyli sól o organicznym anionie.

Zestawienie wyników

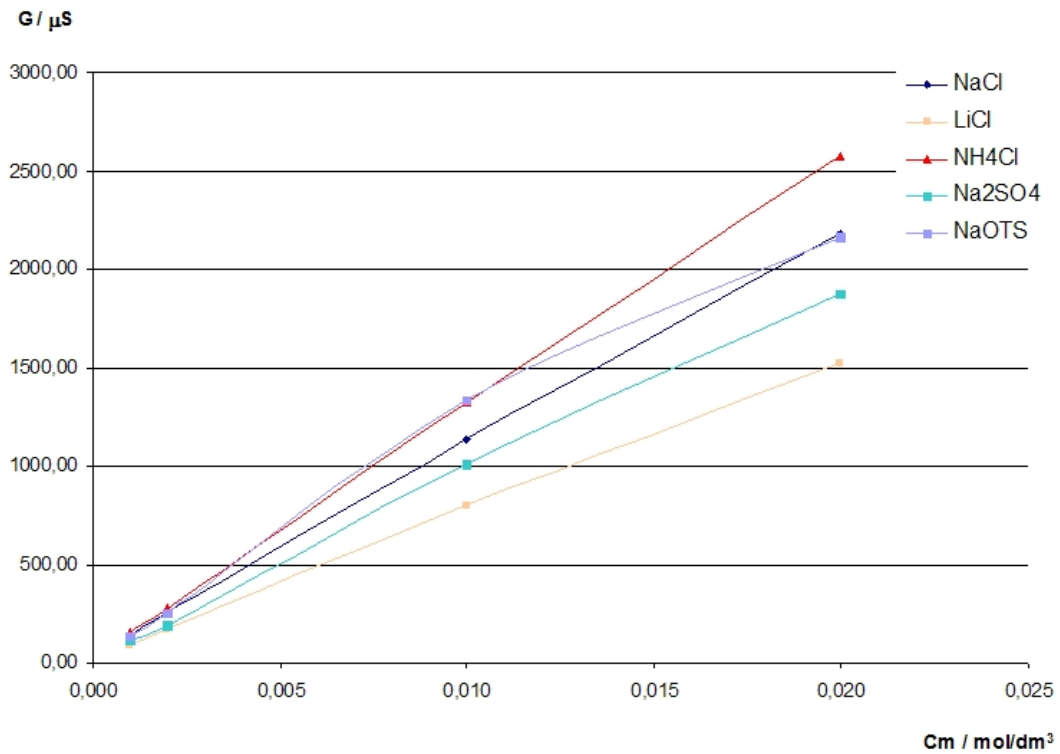
Wyniki pomiarów przedstawiono na rysunkach od 3-3 do 3-12 oraz w Tabelach 3-1 i 3-2.

Tabela 3-1 Przewodność roztworów soli w wodzie.

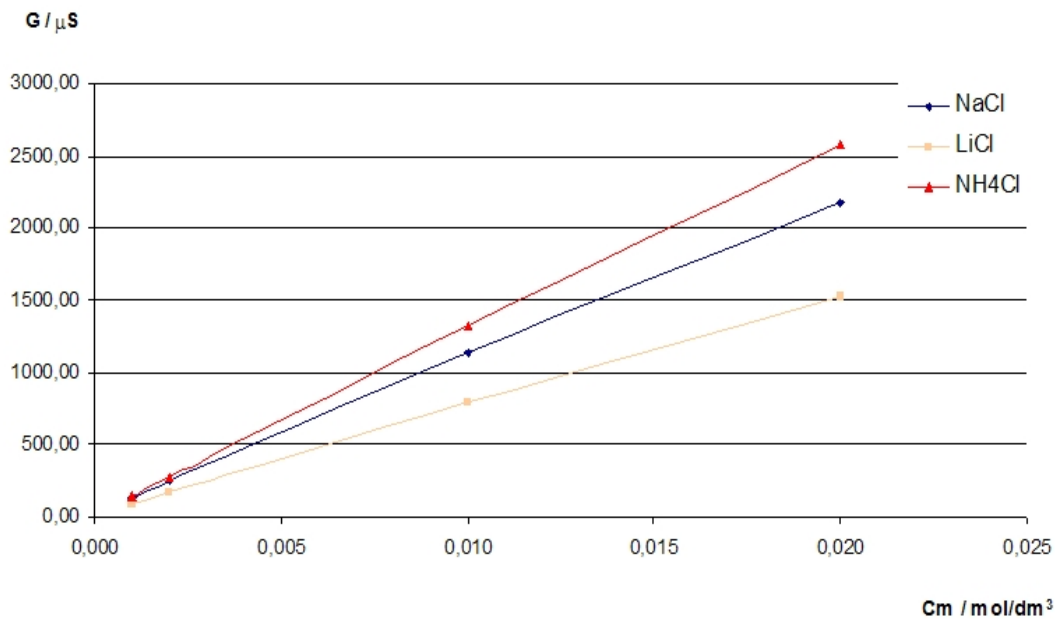
C _m / mol/dm ³	G / μS				
	NaCl	LiCl	NH ₄ Cl	Na ₂ SO ₄	NaOTs
0,020	2181,00	1520,67	2572,67	3754,60	2158,67
0,010	1136,50	798,27	1326,40	2015,00	1331,33
0,002	255,80	175,18	283,40	379,43	247,97
0,001	134,90	92,77	151,59	241,00	130,86

Tabela 3-2 Przewodność roztworów soli w 40% roztworze wodno-etanolowym.

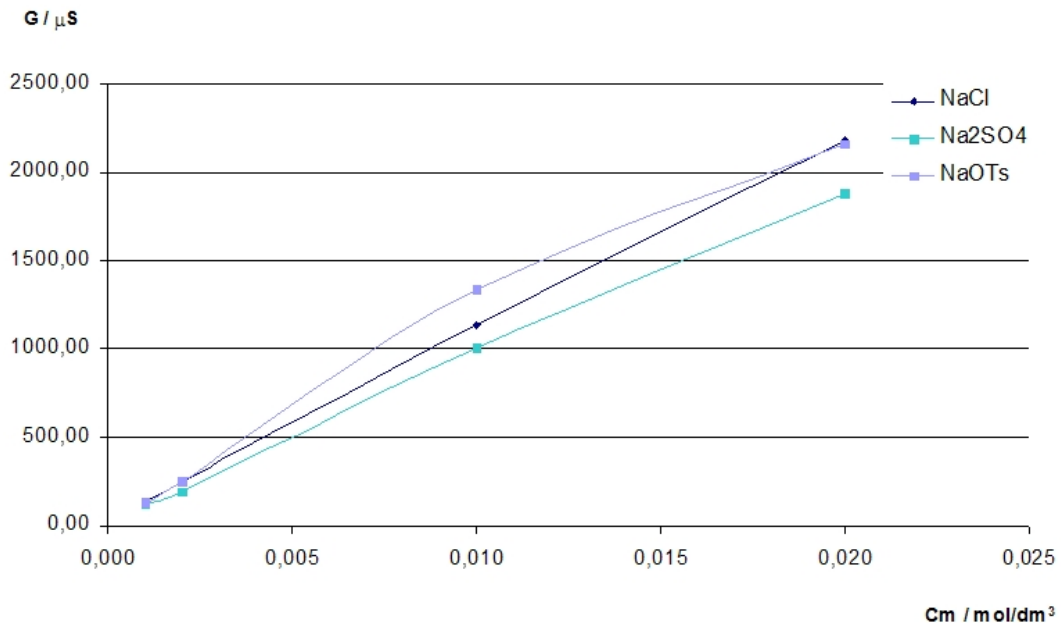
C _m / mol/dm ³	G / μS				
	NaCl	LiCl	NH ₄ Cl	Na ₂ SO ₄	NaOTs
0,020	741,333	551,933	906,133	1049,433	828,267
0,010	399,467	280,600	457,800	599,167	480,100
0,002	86,363	61,887	101,250	151,567	95,150
0,001	40,987	31,130	54,983	85,567	56,587



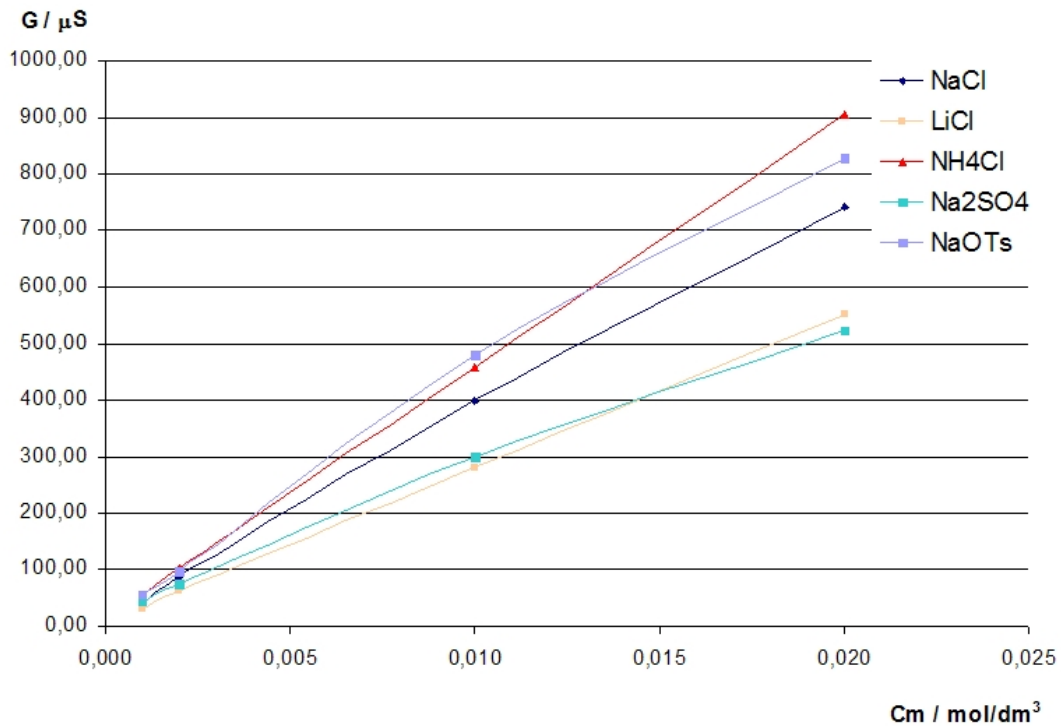
Rys. 3-3 Przewodność w zależności od stężenia soli w roztworze wodnym.



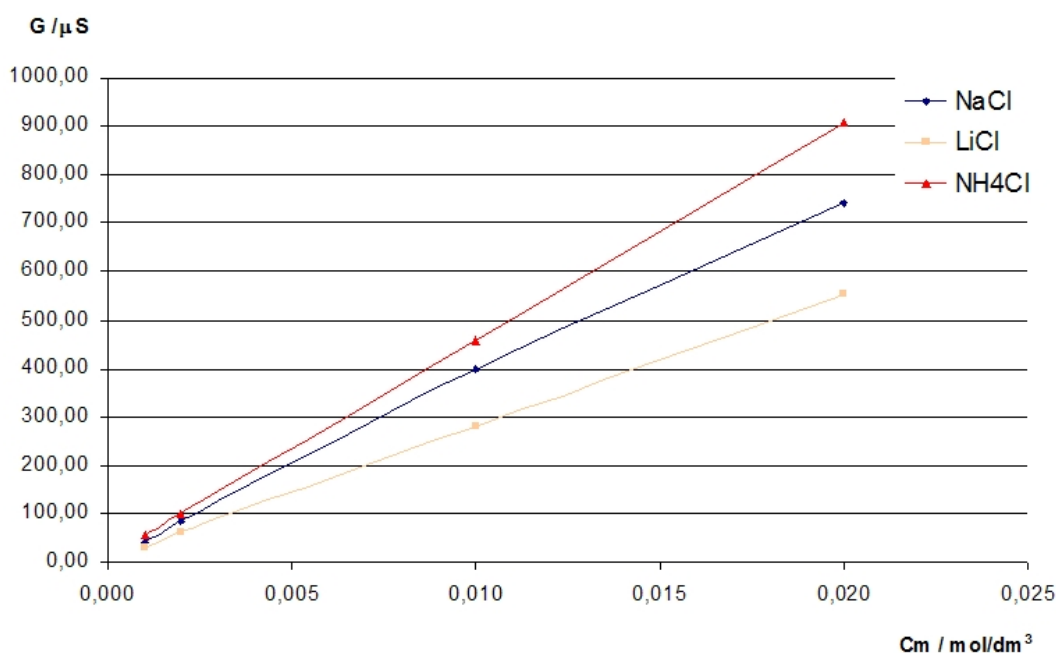
Rys. 3-4 Porównanie przewodności soli zawierających aniony chlorkowe (roztwory wodne).



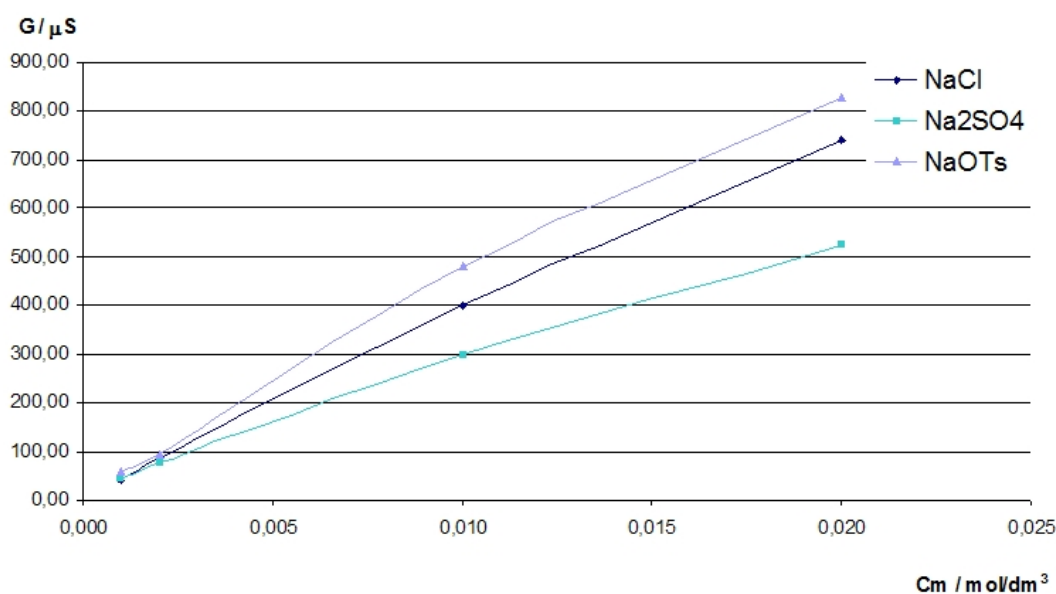
Rys. 3-5 Porównanie przewodności soli sodowych zawierających różne aniony (roztwory wodne).



Rys. 3-6 Zależność przewodności od stężenia soli w roztworze wodno-etanolowym.

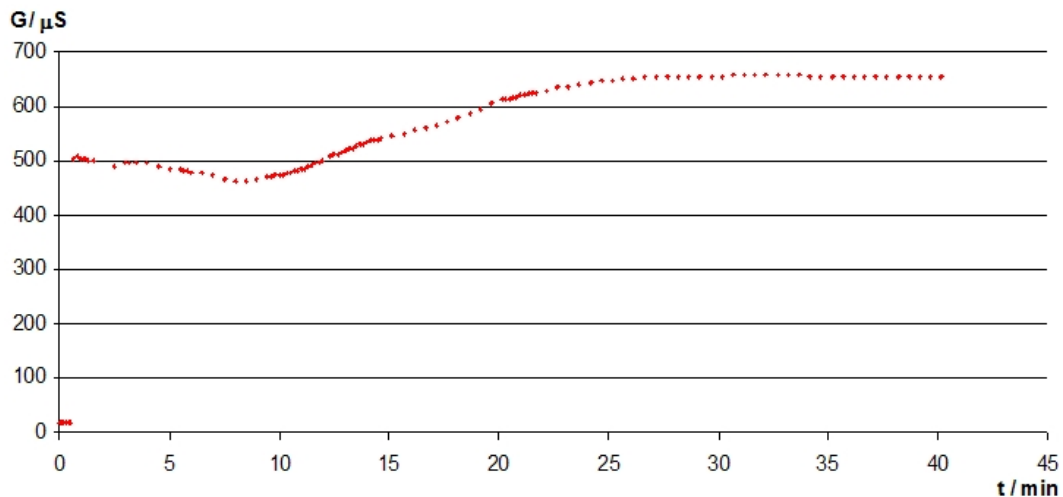


Rys. 3-7 Porównanie przewodności soli zawierających aniony chlorkowe (roztwory wodno-etanolowe).



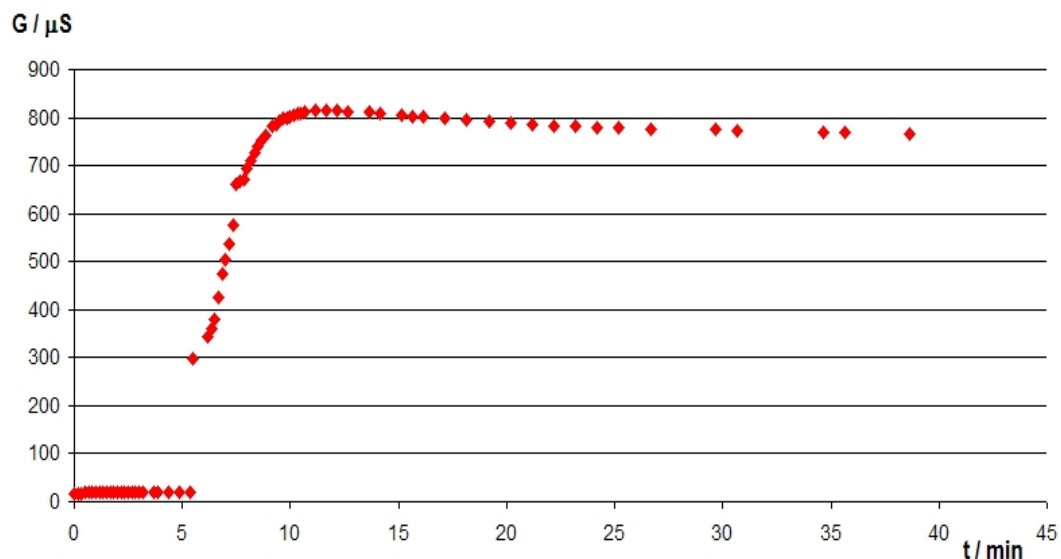
Rys. 3-8 Porównanie przewodności soli sodowych zawierających różne aniony (roztwory wodno-etanolowe).

Przy badaniu przewodności PEO z dodatkiem NaCl w 40% etanolu do 25g. 3% roztworu dodano 0,025g soli (0,1g 25% roztworu NaCl w wodzie), uzyskując stosunek masowy PEO:NaCl równy 30:1. Bezpośrednio po wprowadzeniu soli rozpoczęto pomiar przewodności roztworu (Rys. 3-9). Obserwowano początkowy nagły wzrost przewodności (około 480 μ S), następnie niewielki spadek (około 40 μ S) i ponowny wzrost (około 200 μ S) aż do osiągnięcia maksimum przewodności (657,2 μ S). Pomiar prowadzono do ustalenia się wskazań konduktometru.



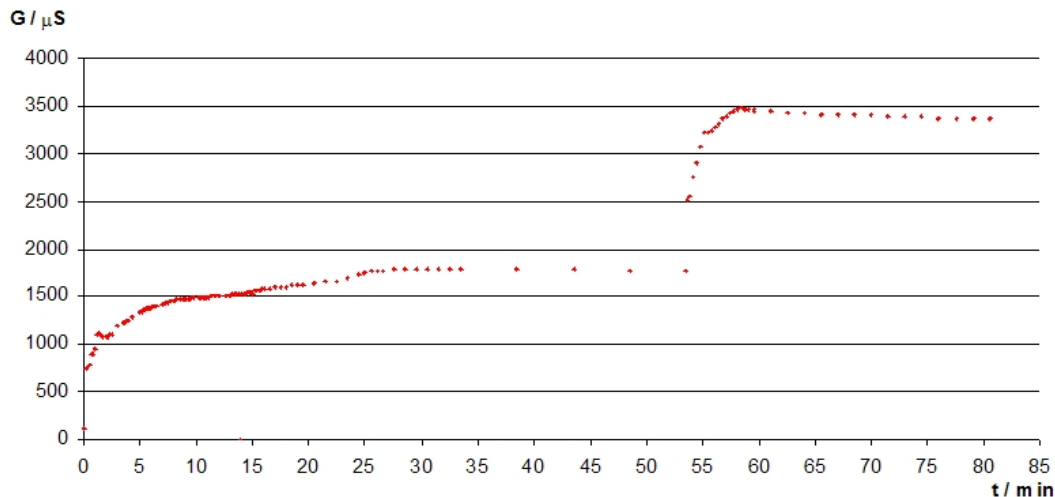
Rys. 3-9 Przewodność 3% roztworu PEO w 40% etanolu z dodatkiem NaCl.

Ważne na pokazanym wykresie jest stopniowo rosnące przewodnictwo. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników pomiar powtórzono dla roztworu o identycznym składzie (Rys. 3-10). Tym razem nie obserwowano spadku przewodności, natomiast wzrost do osiągnięcia maksimum był znacznie większy i szybszy (prawie $800\mu\text{S}$ w ciągu około 5 minut) niż poprzednio (około $200\mu\text{S}$ w ciągu 27 minut).



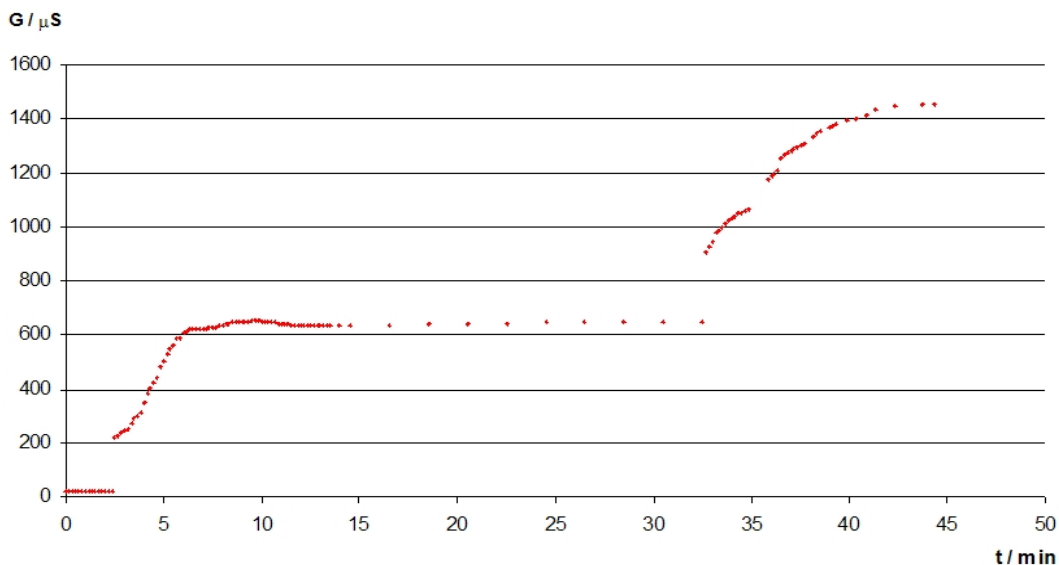
Rys. 3-10 Przewodność 3% roztworu PEO w 40% Etanolu z dodatkiem NaCl (eksperyment powtórzony).

W celu porównania zachowania roztworów wodnych i wodno-etanolowych pomiar przewodności wykonano w analogicznym eksperymencie z 3% roztworem PEO w wodzie destylowanej (Rys. 3-11). Do roztworu jak uprzednio dwukrotnie dodano $0,025\text{g}$ NaCl. Podobnie do wyniku z Rys. 3-10 dla roztworu wodno-etanolowego nie obserwowano spadku przewodności. W przypadku pierwszego dodatku soli czas do osiągnięcia maksimum przewodności wynosił około 25 minut, natomiast w przypadku drugiego dodatku soli wzrost był znacznie szybszy - około 5 minut.



Rys. 3-11 Przewodność 3% roztworu PEO w wodzie destylowanej z dodatkiem NaCl.

Dalej przewodność roztworu PEO z dodatkiem NH_4Cl w 40% etanolu badano dodając 0,025g NH_4Cl (0,1g 25% roztw. NH_4Cl w wodzie) do 25g. 3% roztworu PEO w 40% etanolu i uzyskując stosunek masowy PEO: NH_4Cl równy 30:1. Wykonano pomiar przewodności otrzymanego roztworu (Rys. 3-11). Zaobserwowano znaczny wzrost przewodności (około $630\mu\text{S}$ w ciągu 8 minut przy pierwszym i około $800\mu\text{S}$ w ciągu 10 min. przy drugim dodatku soli), a następnie, po osiągnięciu maksimum ($650,5\mu\text{S}$ po pierwszym $1452\mu\text{S}$ po drugim dodatku), ustalenie wskazań konduktometru. Podobne wyniki uzyskano wcześniej w przypadku dodatku NaCl.



Rys. 3-12 Przewodność 3% roztworu PEO w 40% etanolu z dodatkiem NH_4Cl .

Wnioski z eksperymentów

Dokonano zestawienia wyników przeprowadzonych pomiarów zmian przewodności badanych roztworów w czasie (Tabela 3-3).

Śród dwóch identycznych roztworów etanolowych PEO z dodatkiem NaCl, dla pierwszego uzyskano wyniki bardzo podobne jak dla roztworu z dodatkiem NH_4Cl , różny był jednak czas potrzebny do osiągnięcia maksimum przewodności - dla NaCl większy o około 22 minuty. W przypadku drugiego roztworu z dodatkiem NaCl przewodność początkowa (zmierzona przed dodaniem soli) jest porównywalna z przewodnościami pozostałych roztworów, natomiast znacznie większa (o około $150\mu\text{S}$) jest jego przewodność końcowa.

Dla roztworu wodnego PEO z dodatkiem NaCl uzyskano znacznie większe wartości zarówno przewodności początkowej jak i maksymalnej w porównaniu z roztworami wodno-etanolowymi.

Tabela. 3-3 Zestawienie wyników.

	PEO z NaCl w EtOH/ H ₂ O (1)	PEO z NaCl w EtOH/ H ₂ O (2)	PEO z NaCl w H ₂ O	PEO z NH ₄ Cl w EtOH/ H ₂ O
G ₀ / μS	20	18	750	18,8
G _{max} / μS	657,2	815,7	1789,5	652,2
ΔG / μS	637,2	797,7	1039,5	633,4
Δt / min	27,7	5,84	29,5	7,5

Porównano również wartości przewodności roztworów PEO z dodatkiem soli z roztworami o identycznej zawartości soli (0,02M stężenie soli w roztworze), ale niezawierającymi polimeru (Tabela 3-4).

Tabela 3-4 Porównanie przewodności roztworów soli zawierających PEO i niezawierających polimeru.

	roztwory wodne		roztwory wodno-etanolowe			
	NaCl		NaCl		NH ₄ Cl	
	z PEO	bez PEO	z PEO	bez PEO	z PEO	bez PEO
G _{max} / μS	1789,5	2181,0	657,2	741,3	652,2	908,0
ΔG / μS	391,5		84,1		255,8	

W badaniach konduktometrycznych, pomimo pewnej niekonsystentności wyników stwierdzono możliwość istnienia efektów histerezy próbki. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że przewodnictwo zmierzone dla sporządzonej zewnętrznie próbki roztworu polimeru może być znacząco różne od występującego w odparowującej strudze polimeru. Spostrzeżenie to może posłużyć do ulepszenia danych wejściowych w rozwijanym w Zakładzie modelu numerycznym procesu elektroprzędzenia.

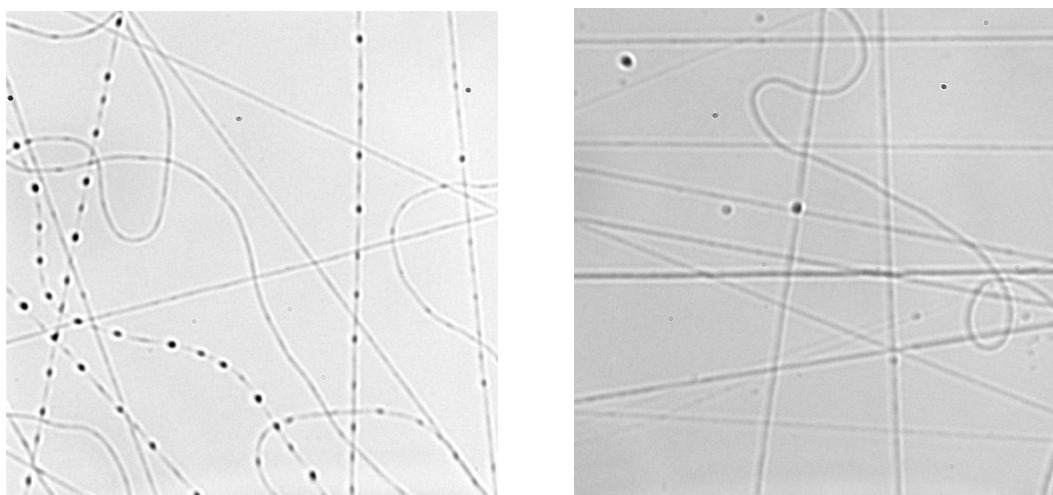
Uzyskane wyniki nie wskazują na wyraźną interakcję pomiędzy łańcuchami polimeru a jonami metalu w roztworze wodno-etanolowym. Jony metalu były silnie sol watomane (kompleksowane) przez cząsteczki wody i nie mogły ulec skompleksowaniu przez łańcuch polimeru.

3.2.3 Badania wpływu soli na elektroprzędzenie nanowłókien PEO

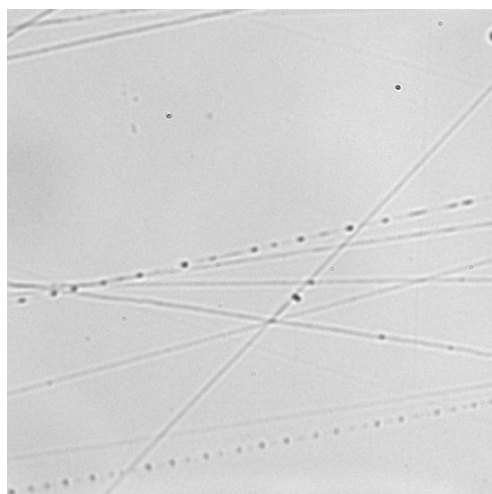
Prowadząc badania wpływu soli na elektroprzędzenie starano się zaobserwować, czy wystąpią różnice w uzyskanej jakości nanowłókien. Analizowano wyniki elektroprzędzenia włókien z 3% roztworu PEO w 40% etanolu z dodatkiem trzech rodzajów soli (NaCl, LiCl i NH₄Cl) użytych w dwóch stosunkach masowych względem polimeru (1:30 i 1:60). W celach porównawczych elektroprzędzono również włókna PEO bez dodatku soli.

Wszystkie eksperymenty prowadzono przy ustalonych warunkach szybkości wypływu roztworu z dyszy – 0,2ml/h oraz odległości między wylotem z dyszy a targetem – 15cm, w temperaturze otoczenia około 23°C i wilgotności powietrza wahającej się od 40 do 50%. Zmieniano wartości napięcia między elektrodami, monitorując proces poprzez pomiar wartości prądu przepływającego przez układ. Uzyskane włókna obserwowano i fotografowano przy użyciu mikroskopów optycznego oraz elektronowego. Wybrane przykłady zdjęć zamieszczone są poniżej.

Zdjęcia otrzymanych włókien zrobione pod mikroskopem optycznym



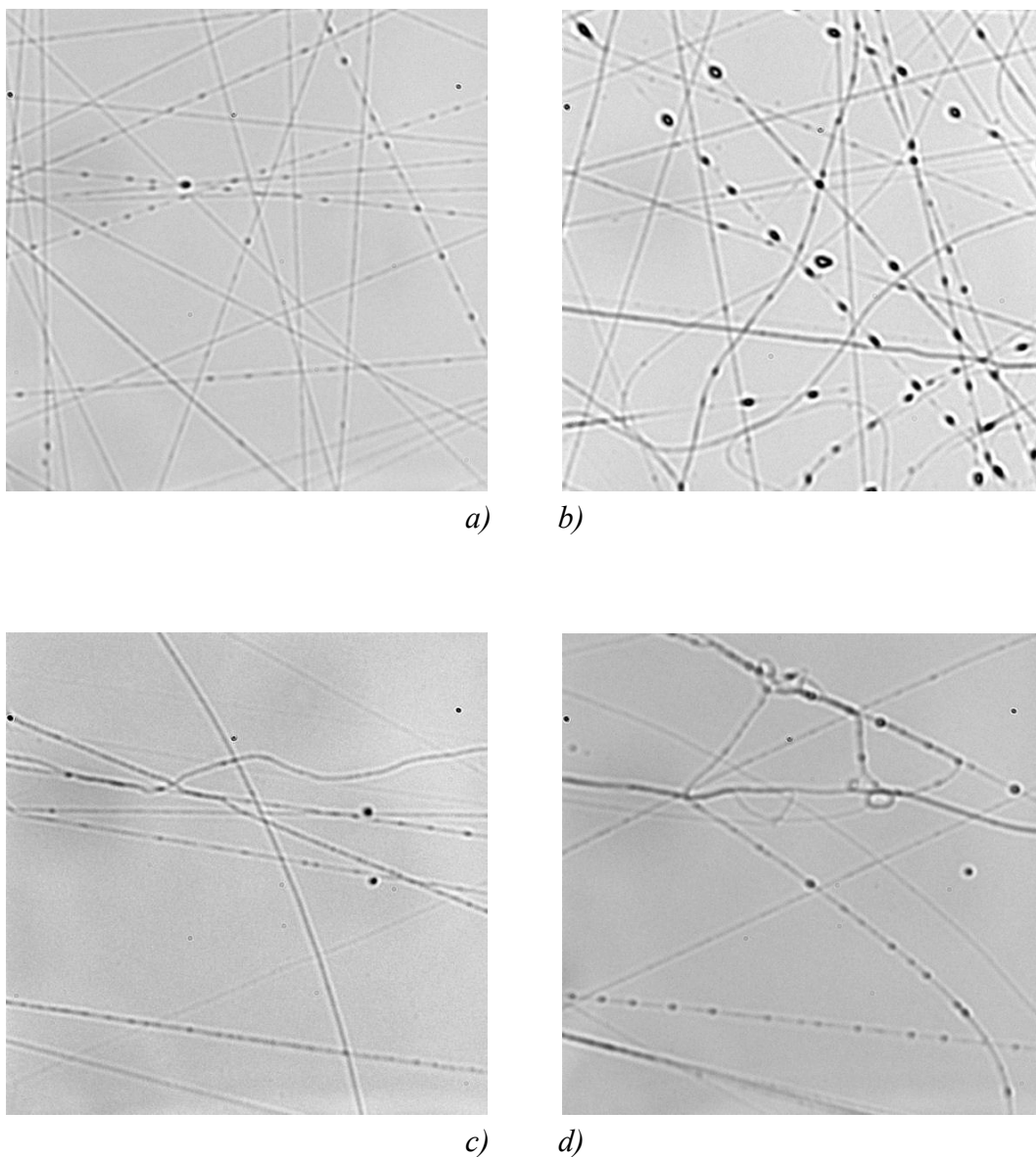
a) b)



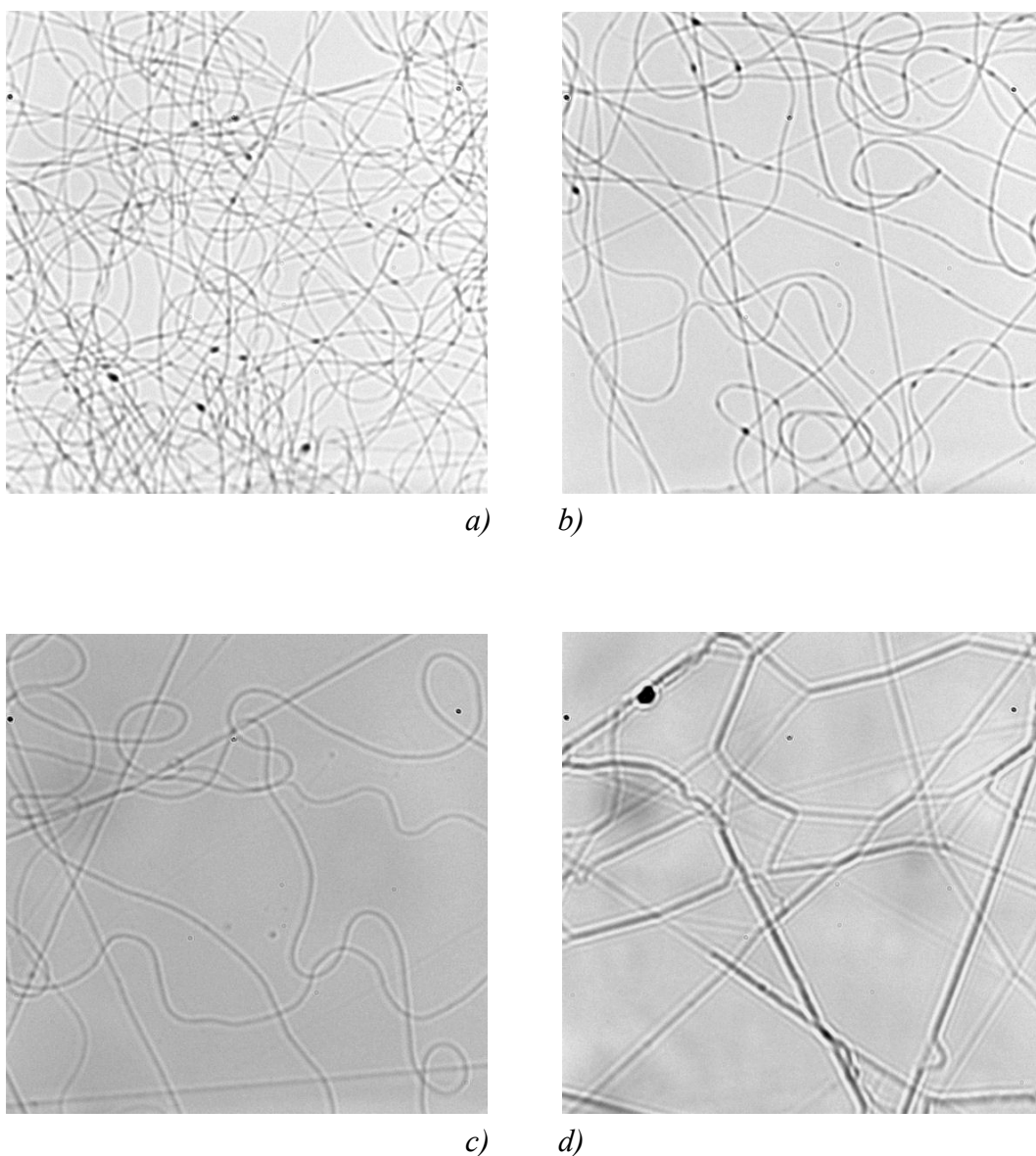
c)

Rys. 3-13 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO bez dodatku soli, uzyskanych dla różnych wartości napięcia:

a) 5kV, b) 20kV, c) 30kV.

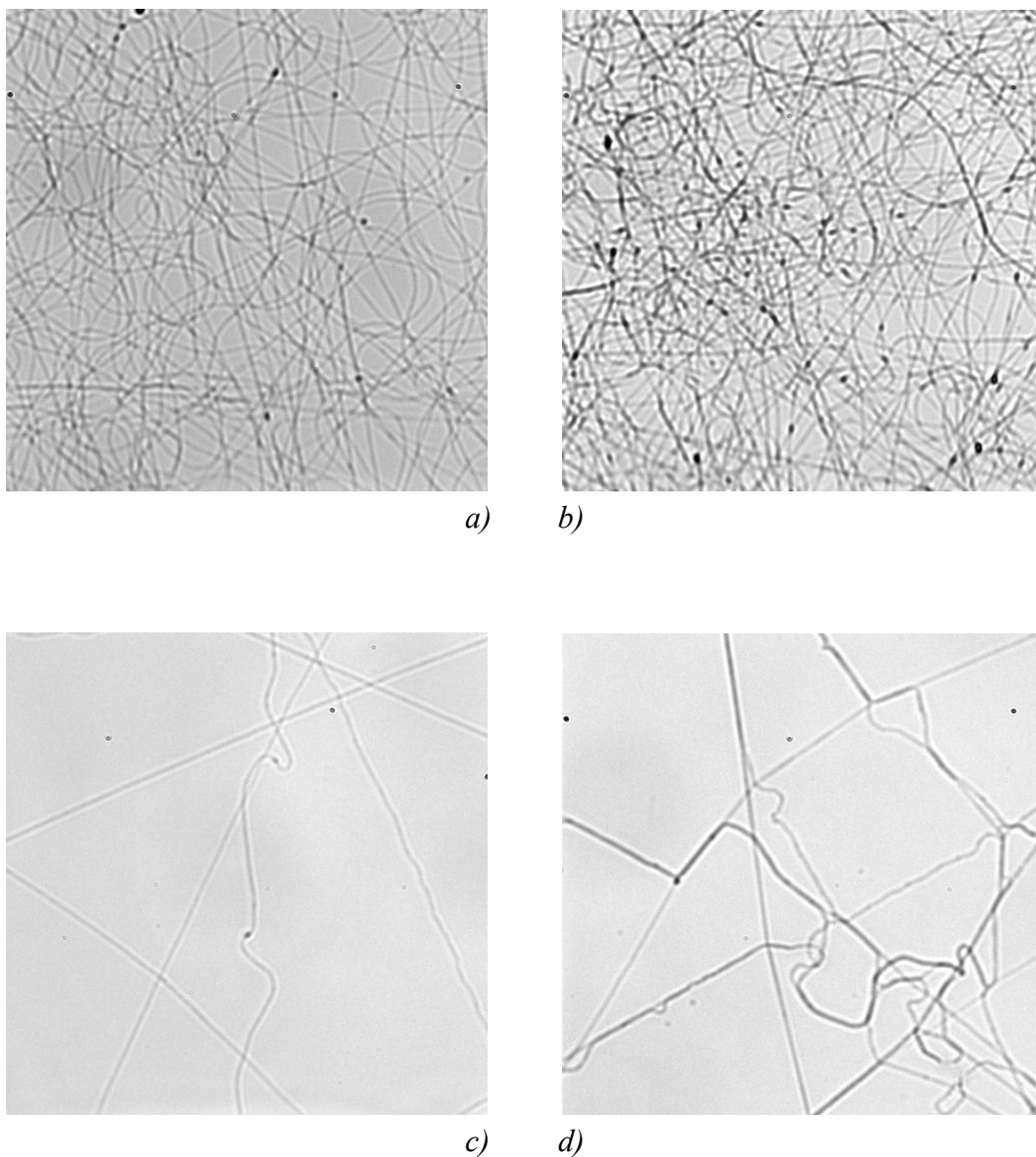


Rys. 3-14 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem NaCl w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia: a) 5kV, b) 10kV, c) 20kV, d) 30kV.

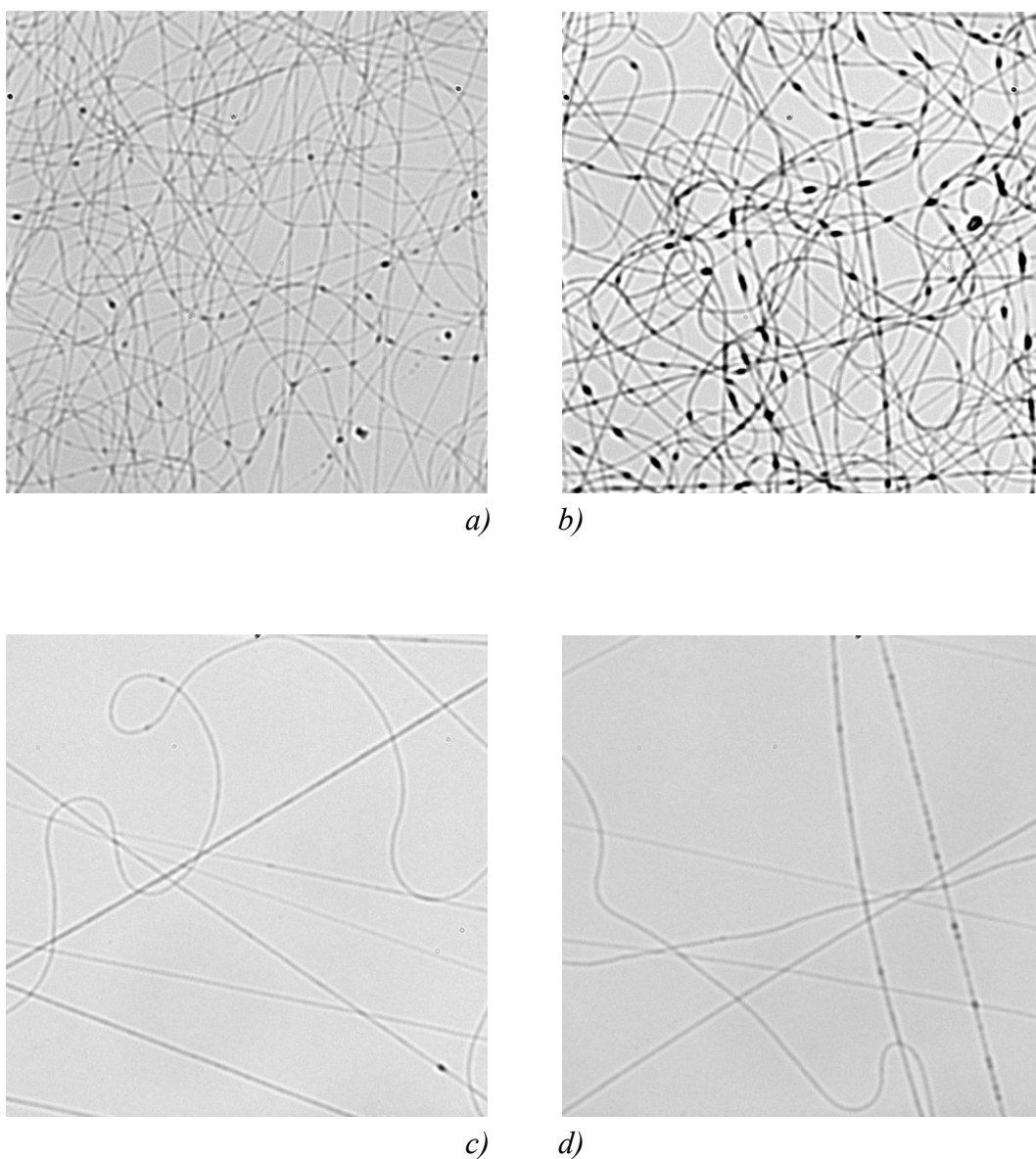


Rys. 3-15 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem LiCl w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia:
a) 5kV, b) 10kV, c) 20kV, d) 30kV.

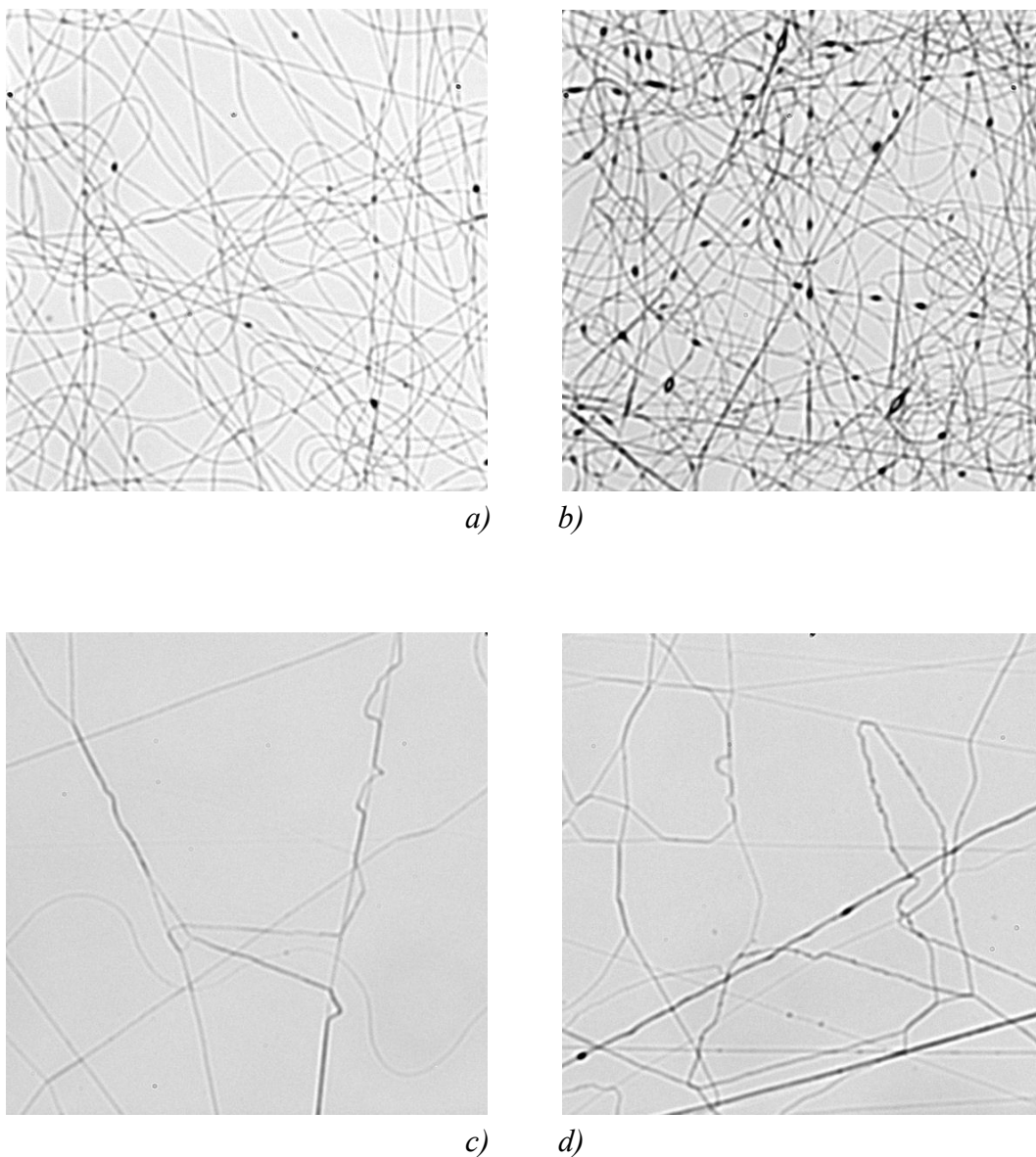
Dla włókien z dodatkiem LiCl w stosunku masowym 1:30 względem polimeru, przy wartości napięcia 10kV obserwowano zjawisko tworzenia się pajęczyny z gęstej sieci włókien, opartej na drutach targetu i narastającej stopniowo w górę ku dyszy z wypływającym roztworem. Zjawisko to obserwowane było również w przypadku włókien z dodatkiem NH_4Cl w stosunku masowym 1:30 względem polimeru (ale nie dla włókien z NaCl w tym samym stosunku masowym) oraz dla włókien z NaCl i LiCl w stosunku masowym 1:60 względem polimeru (dla włókien z NH_4Cl w tym stosunku masowym nie obserwowano tworzenia pajęczyny). Zjawisko tworzenia takiej pajęczyny obserwowano tylko dla wartości napięcia 10kV.



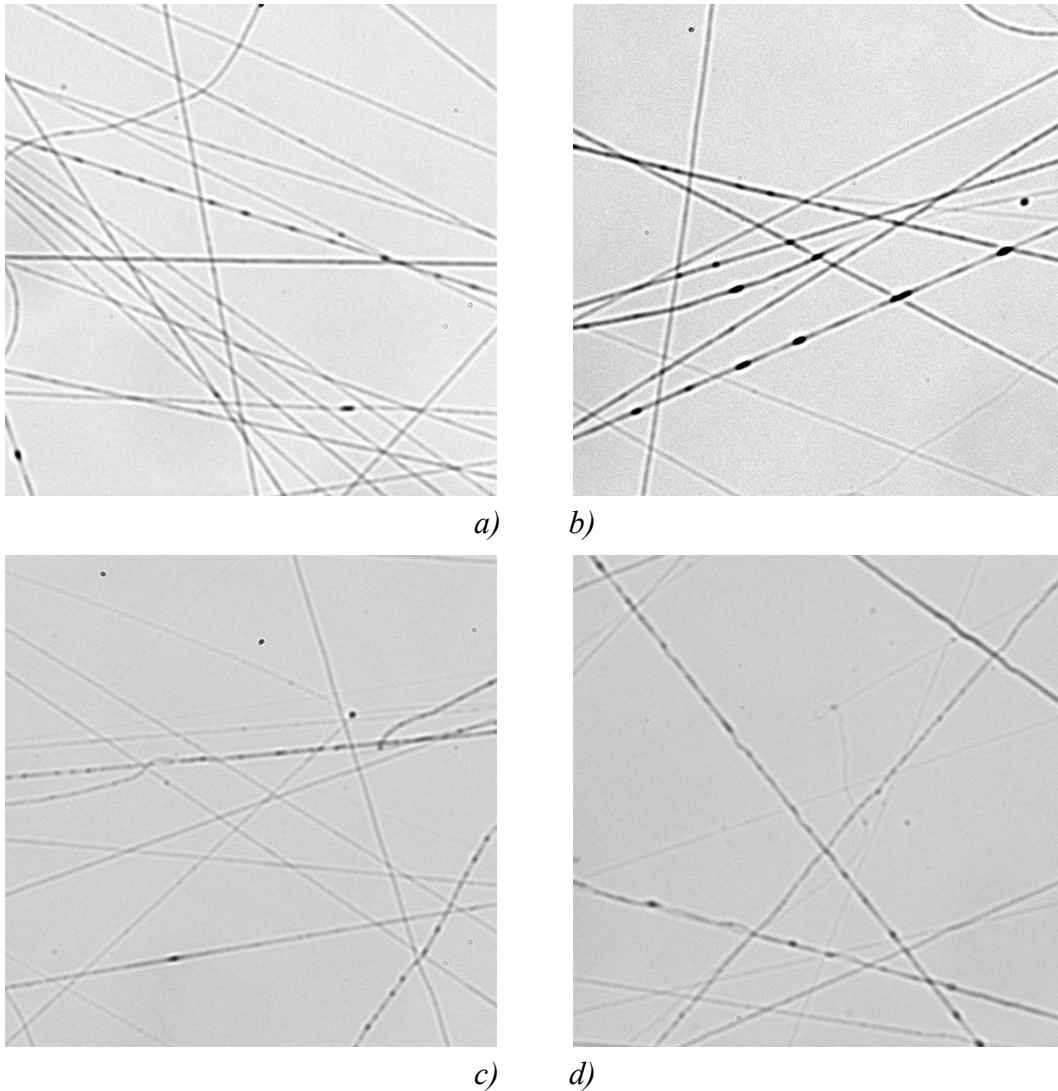
Rys. 3-16 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem NH_4Cl w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia: a) 5kV, b) 10kV, c) 20kV, d) 30kV.



Rys. 3-17 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem NaCl w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia: a) 5kV, b) 10kV, c) 20kV, d) 30kV.

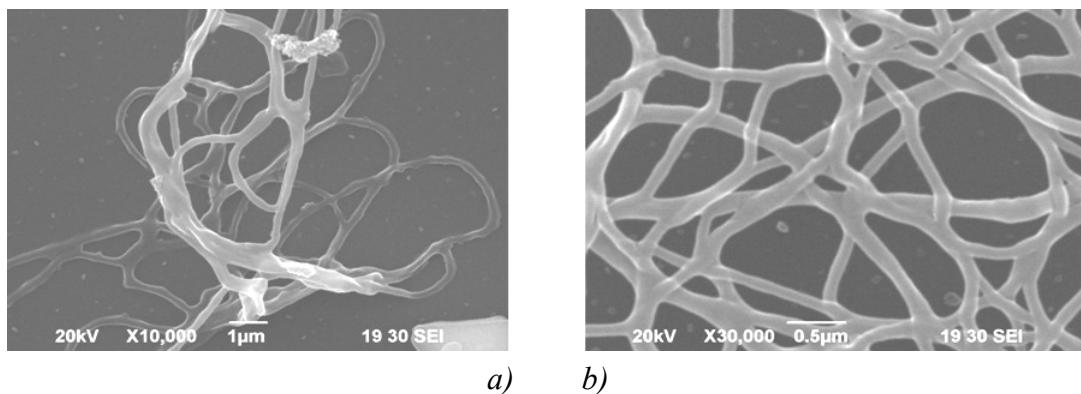


Rys. 3-18 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem LiCl w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia: a) 5kV, b) 10kV, c) 20kV, d) 30kV.

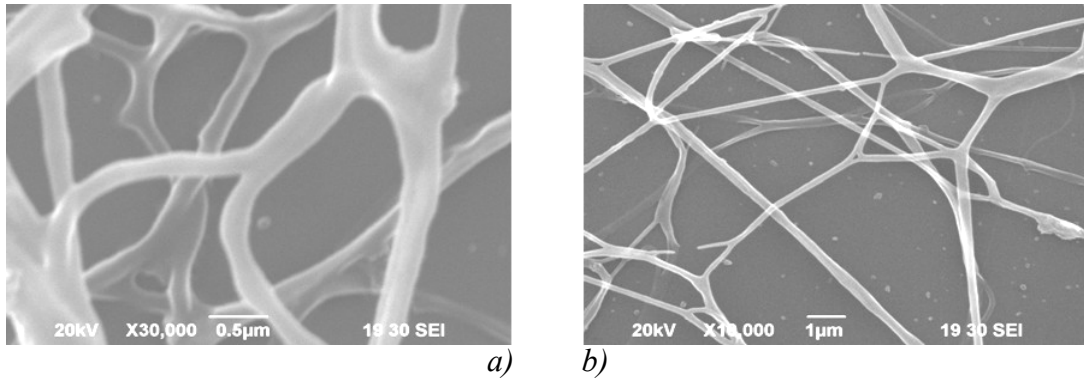


Rys. 3-19 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem NH_4Cl w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia:
a) 5kV, b) 10kV, c) 20kV, d) 30kV.

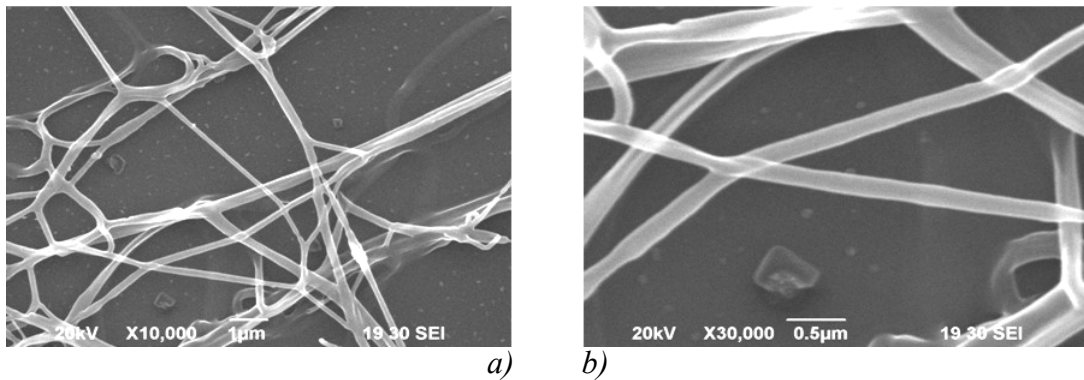
Zdjęcia włókien pod otrzymane z mikroskopu elektronowego



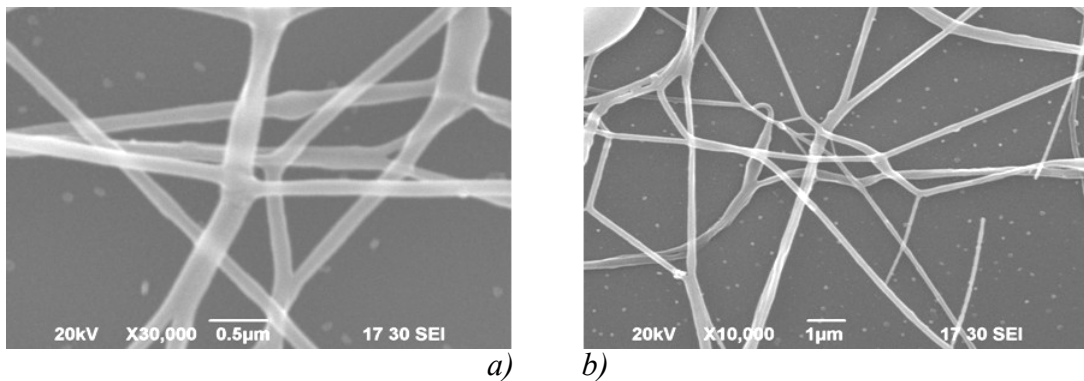
Rys. 3-20 Fotografie SEM włókien PEO z dodatkiem NaCl w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla wartości napięcia 30kV, w różnych powiększeniach: a) 10.000, b) 30.000.



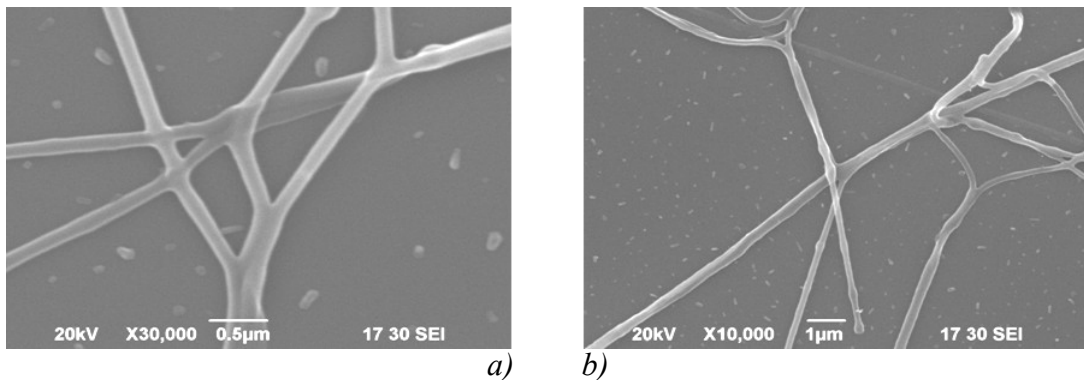
Rys. 3-21 Fotografie SEM włókien PEO z dodatkiem LiCl w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla wartości napięcia 30kV, w różnych powiększeniach: a) 10.000, b) 30.000.



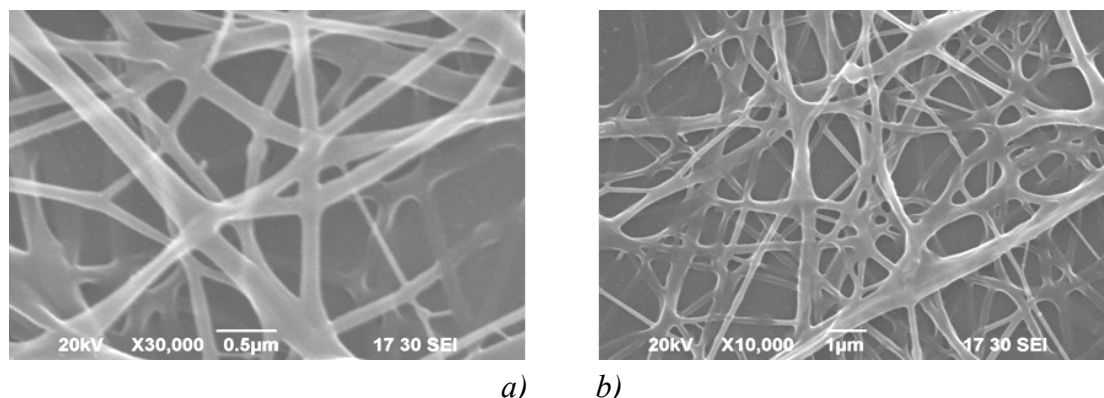
Rys. 3-22 Fotografie SEM włókien PEO z dodatkiem NH_4Cl w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla wartości napięcia 30kV, w różnych powiększeniach: a) 10.000, b) 30.000.



Rys. 3-23 Fotografie SEM włókien PEO z dodatkiem NaCl w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla wartości napięcia 10kV, w różnych powiększeniach: a) 10.000, b) 30.000.



Rys. 3-24 Fotografie SEM włókien PEO z dodatkiem LiCl w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla wartości napięcia 30kV, w różnych powiększeniach: a) 10.000, b) 30.000.



Rys. 3-25 Fotografie SEM włókien PEO z dodatkiem NH_4Cl w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla wartości napięcia 30kV, w różnych powiększeniach: a) 10.000, b) 30.000.

Wnioski

Wykazano podobny wpływ dodatku różnych soli na proces elektroprzędzenia roztworu modelowego polimeru – poli(tlenku etylenu). Uzyskane wyniki pokazują, że niezależnie od użytego kationu zawartego w soli otrzymano podobne nanowłókna. Żaden z badanych kationów nie wykazywał zwiększonego powinowactwa do łańcucha polimeru. Również zastosowanie różnych anionów, także organicznych, nie pokazało znaczących różnic w badanych układach. Badania z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) pokazały obecność nanowłókien niezależnie od rodzaju użytej soli. Wyniki te zaprzeczają doniesieniom literaturowym, w których stwierdzono, że jedynie dodatek NaCl, pozwolił na otrzymanie włókien. Użycie innych soli dawało heterogenny materiał zanieczyszczony kryształami soli.

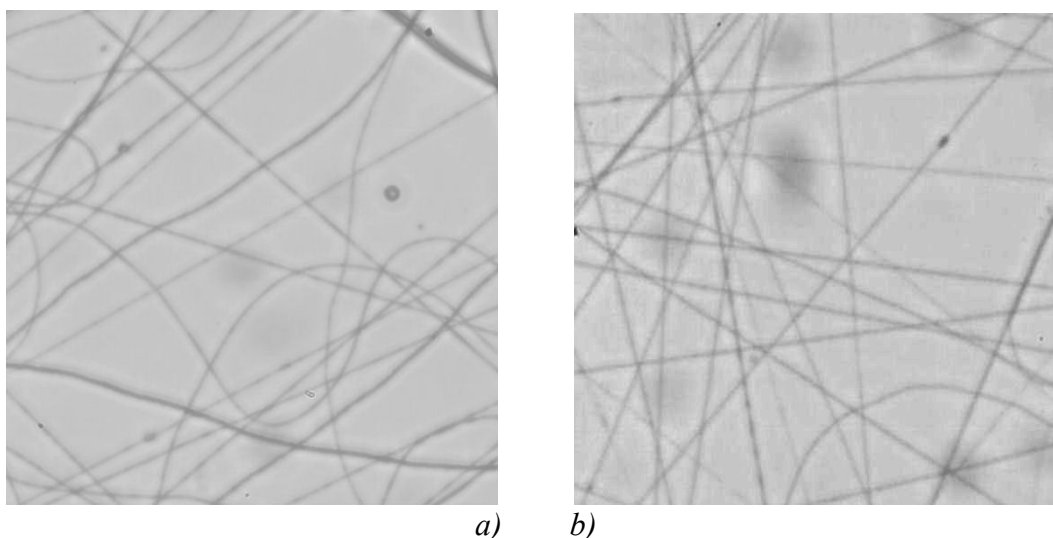
Badania SEM potwierdziły możliwość użycia włókien do konstrukcji kontaktów typu FRET (kontakty z transferem energii fluorescencji) osiągających wielkość poniżej $1 \mu\text{m}^2$. Pomimo obecności kontaktów „stopionych”, powstających podczas kontaktu z podłożem strugi niezupełnie odparowanej uzyskano również „suche” kontakty o wielkości np. $100 \times 200 \text{ nm}$.

3.2.4 Badania wpływu soli na elektroprzędzenie metanolowego roztworu PEO

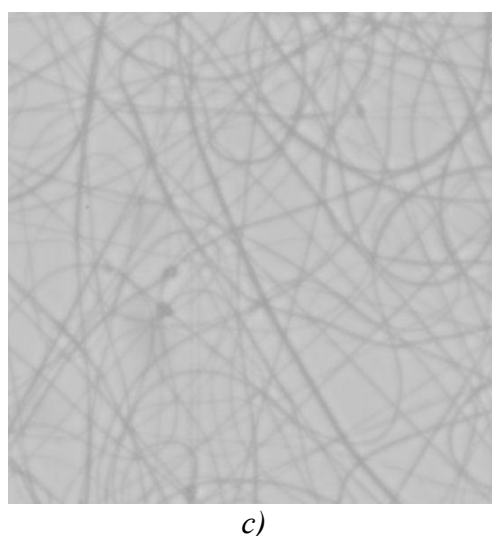
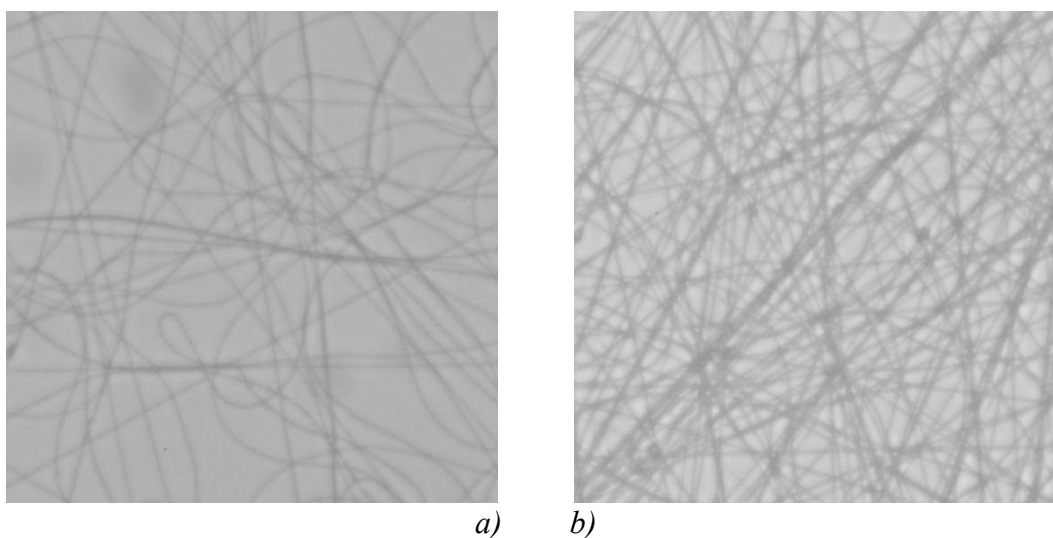
Badano proces elektroprzędzenia włókien z 3% roztworu PEO w czystym metanolu (MeOH) z dodatkiem soli: KBr, LiBr oraz NaBr w stosunku masowym 1:30 i 1:60 względem polimeru. W celach porównawczych elektroprzędzono również włókna PEO bez dodatku soli.

Wszystkie eksperymenty prowadzono przy ustalonych warunkach szybkości wypływu roztworu z dyszy – $0,2 \text{ ml/h}$ oraz odległości między wylotem z dyszy a targetem – 15 cm , w temperaturze otoczenia około 25°C i wilgotności powietrza wahającej się od 40 do 45%. Zmieniano wartości napięcia między elektrodami. Uzyskane włókna obserwowano pod mikroskopem optycznym. Obraz zebranych na szkiełka mikroskopowe włókien przedstawiono na rysunkach od 3-26 do 3-31. Uwagi na temat otrzymanego w procesie elektroprzędzenia produktu zamieszczono w Tabeli 3-5.

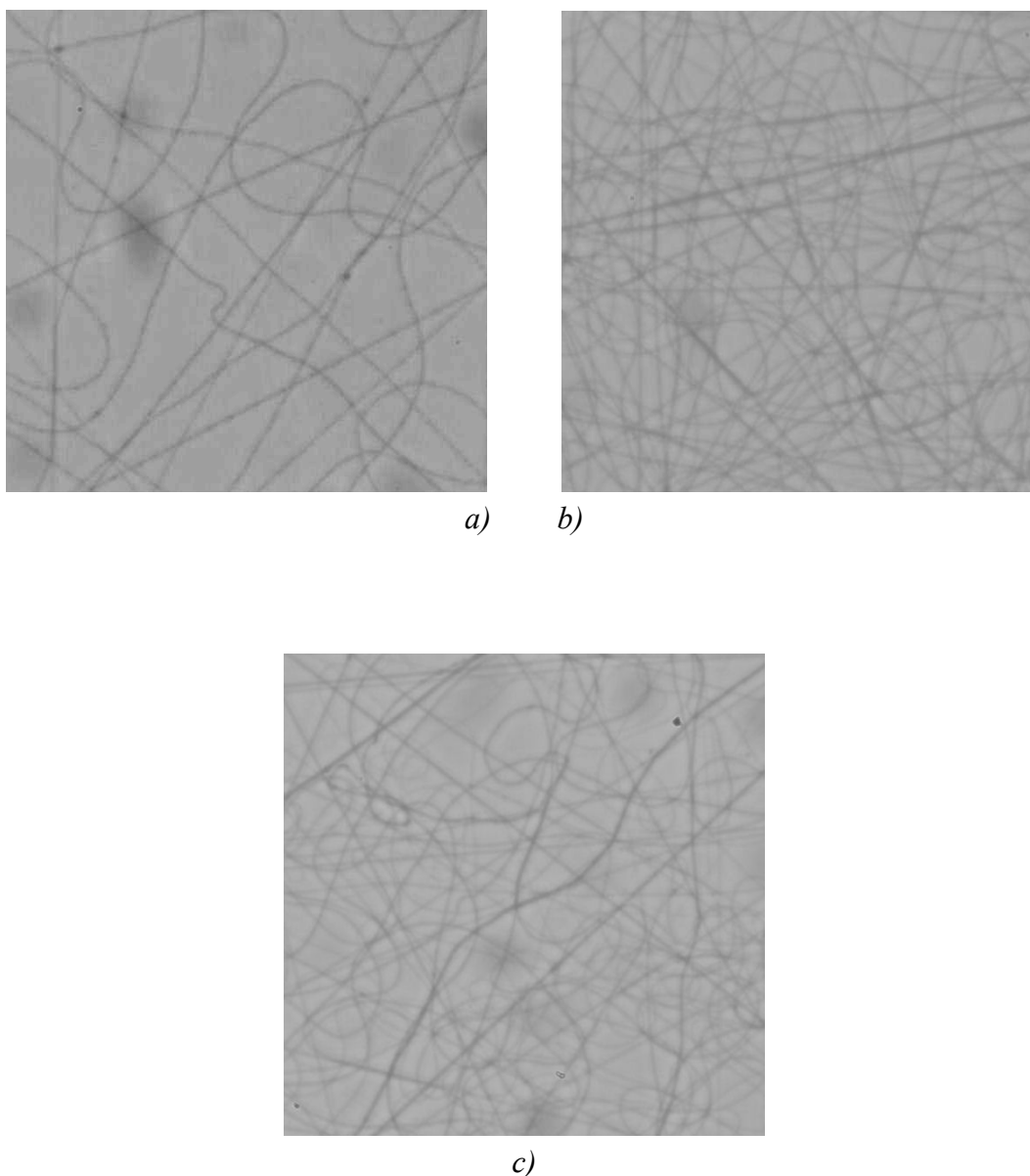
Przeprowadzono również obserwacje eksperymentów z użyciem szybkiej kamery, które umożliwiły zarejestrowanie i pomiar parametrów charakterystycznych dla procesu elektroprzędzenia: długości odcinka prostego oraz kąta rozwarcia stożka (Tabela 3-5).

Zestawienie wyników

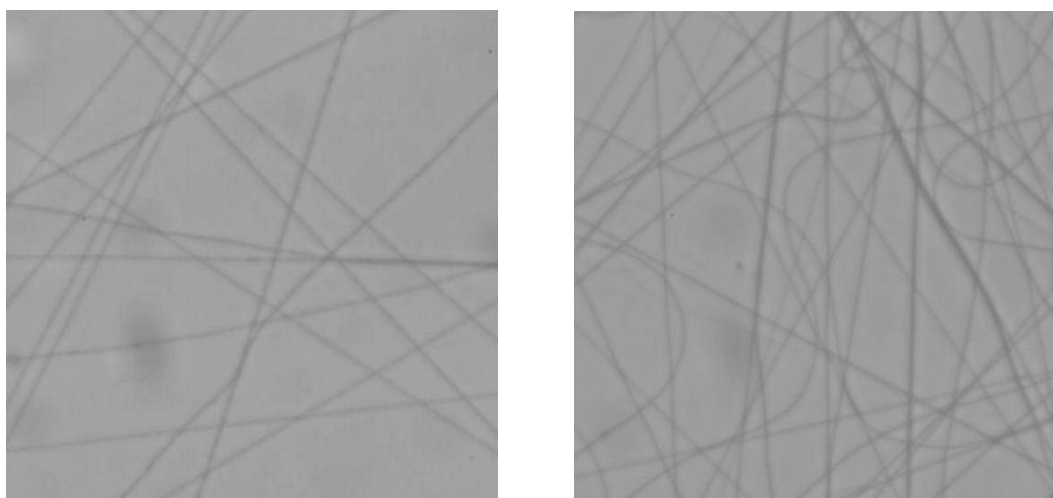
Rys. 3-26 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO bez dodatku soli, uzyskanych dla różnych wartości napięcia: (a) 5kV, (b) 10kV.



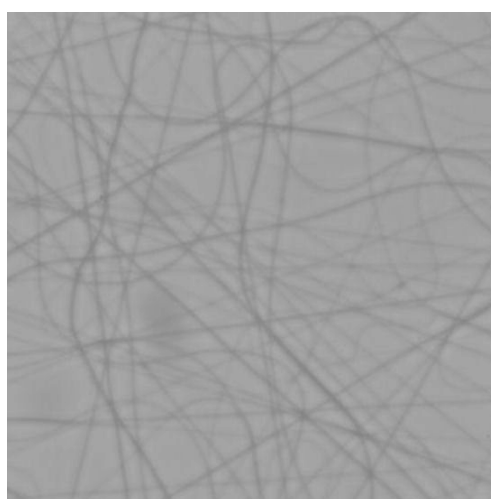
Rys. 3-27 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem NaBr w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia: a) 5 kV, b) 10 kV, c) 15 kV.



*Rys. 3-28 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem KBr w stosunku masowym 30:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia:
a) 5 kV, b) 10 kV, c) 15 kV.*

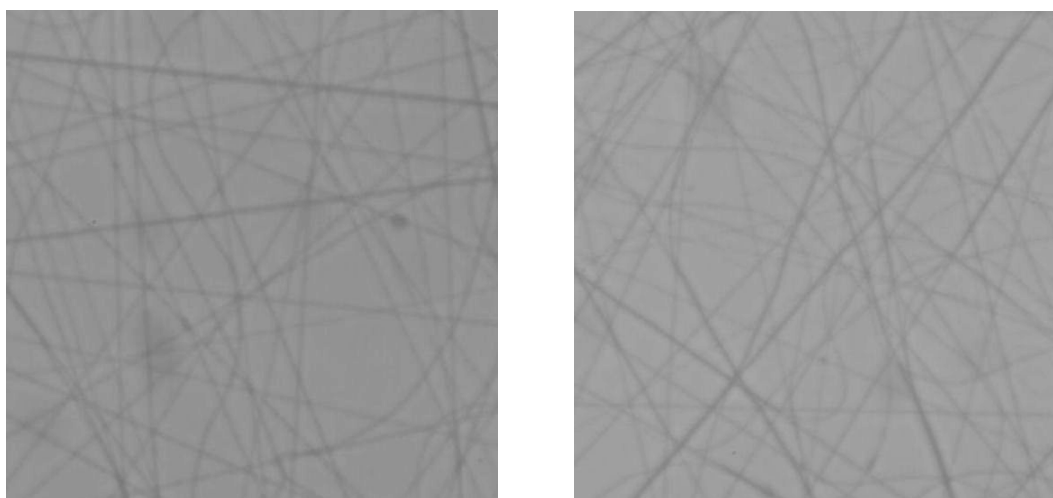


a) b)

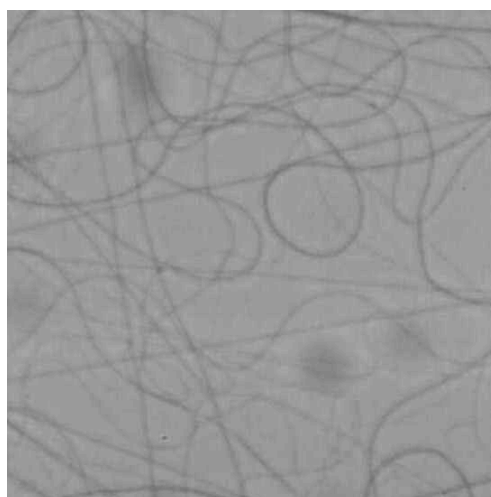


c)

Rys. 3-29 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem NaBr w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia:
a) 5 kV, b) 10 kV, c) 15 kV.

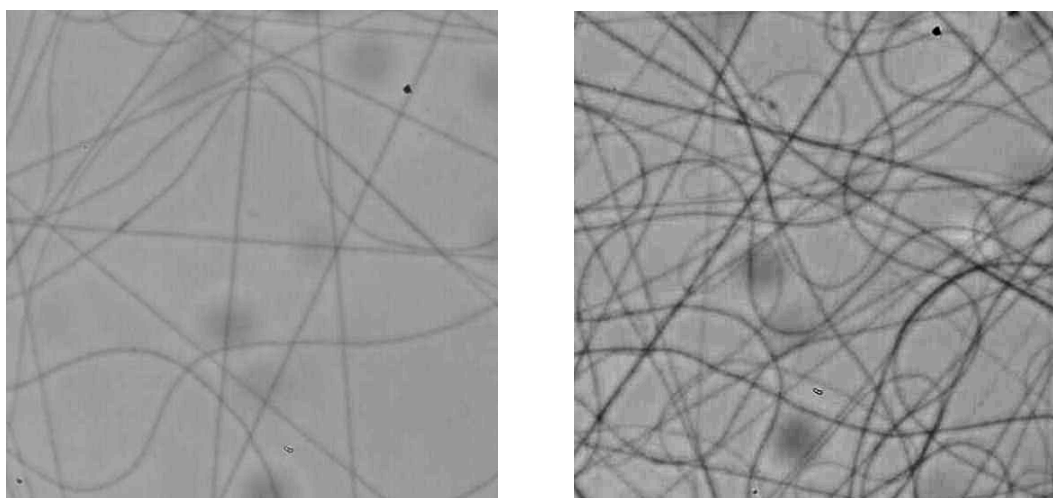


a) b)

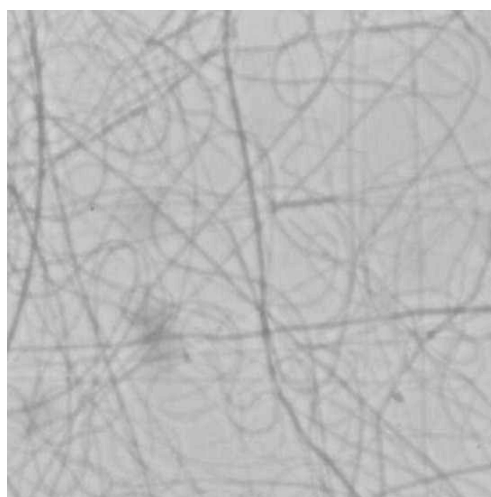


c)

*Rys. 3-30 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem KBr w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia:
a) 5 kV, b) 10 kV, c) 15 kV.*



a) b)



c)

Rys. 3-31 Fotografie włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia PEO z dodatkiem LiBr w stosunku masowym 60:1, uzyskanych dla różnych wartości napięcia:
a) 5 kV, b) 10 kV, c) 15 kV.

#	SÓL	c [mol/L] S [μ S/cm]	E [kV]	I [nA]	A [deg]	L [mm]	INFORMACJE O PRODUKCIE
1	-	0,0	5	30	78,333	66	włókna proste i poskręcane; są pojedyncze zgrubienia jakby kryształy albo b. duże koraliki
		11,43333	10	90	75	47,19	włókna w większości proste, bez koralików
			15	650	35	8,51	gęsta sieć włókien, w większości proste, nieukierunkowane, nieliczne koraliki
2	NaBr	0,1	5	60	66,667	14,41	gęsta sieć poskręcanych włókien; bez koralików
		385,8	10	394	103,33	17,93	bardzo gęsta sieć chaotycznie rozmieszczonych, poskręcanych włókien; bez koralików
			15	1680	71,667	0	bardzo gęsta sieć chaotycznie rozmieszczonych, poskręcanych włókien; niektóre wyraźnie grubsze od innych; bez koralików
3	NaBr	0,05	5	45	90	10,45	włókna w większości proste; bez koralików
		204	10	295	91,667	21,01	pojedyncze koraliki
			15	840	53,333	4,4	włókna bez koralików
4	KBr	0,1	5	55	106,67	13,53	włókna rozmieszczone chaotycznie, poskręcane; bez koralików
		377,4	10	338	88,333	17,82	bardzo gęsta sieć włókien, w większości poskręcane; bez koralików
			15	1045	55	16,72	gęsta sieć poskręcanych włókien; z pojedynczymi defektami - zgrubienia, kryształy albo duże koraliki
5	KBr	0,05	5	48	96,667	24,2	włókna w większości proste; bez koralików
		195,3	10	276	61,667	10,12	włókna proste i poskręcane; w większości bez koralików
			15	770	60	11,88	włókna poskręcane; bez koralików
6	LiBr	0,1	5	75	128,33	6,83	włókna rozmieszczone chaotycznie, bez koralików
		820,0667	10	660	118,33	4,44	włókna rozmieszczone chaotycznie, bez koralików
			15	1690	51,66	0	włókna rozmieszczone chaotycznie, bez koralików, niektóre wyraźnie cieńsze od innych
7	LiBr	0,05	5	50	93,333	17,27	włókna bez koralików
		423,8333	10	360	60	29,7	włókna chaotycznie ułożone; bez koralików
			15	1080	38,333	0	włókna chaotycznie ułożone; niektóre włókna wyraźnie grubsze od innych; pojedyncze koraliki

Tabela 3-5. Wpływ zmiany przewodnictwa elektrycznego (S), potencjału elektrycznego (E), prądu (I) na długość odcinka prostego (L) i kąt rozwarcia stożka (A) tworzonego przez wirującą strugę materiału.

Wnioski

Część badań poświęcona analizie wpływu soli na elektroprzewodzenie metanolowego roztworu PEO pozwala na stwierdzenie silnego kompleksowania kationów litowców przez łańcuch polimeru, co może mieć wpływ na uzyskiwane w procesie elektroprzewodzenia nanowłókna z PEO.

3.3 Nanowłókna z zawartością polimerów przewodzących

Celem badań nad polimerami przewodzącymi z nanowłókien była analiza możliwości tworzenia czujników wrażliwych na stężenie substancji biologicznych. Podstawą działania takich czujników jest reakcja redox enzymu immobilizowanego na nanowłóknie, pojawiająca się w skutek kontaktu enzymu z substancją biologiczną. Przykładowo glukoza w kontakcie z enzymem ulega utlenieniu i następuje zmiana potencjału nanowłókna przewodzącego.

Badano amperometryczne czujniki platynowe pokryte nanowłóknami z poli(3-hydroksymaślanu), PHB, zawierające protonowaną (przewodzącą) polianilinę. W trakcie eksperymentów wykonywano pomiary woltaperometryczne i na podstawie otrzymanych krzywych analizowano wpływ warstwy nanowłókien na charakterystykę czujników.

Przy prowadzeniu eksperymentów używano czujników o dwóch różnych gęstościach pokrycia nanowłóknami. W każdym wypadku pokrycie otrzymywano przy napięciu 15kV.

Czujniki z cienką warstwą nanowłókien

Poniżej omówiono wyniki uzyskane dla czujników z cienką warstwą (o małej gęstości) nanowłókien nanoszonych w czasie 1 minuty przy prędkości podawania roztworu 0.1ml/godzinę. Badane czujniki, oznaczone dalej symbolami P1, P2 i P3, pokryte z różnymi warstwami polianiliny, otrzymano w różny sposób:

P1 - czujnik otrzymany bez użycia maski z poliwęglanu i z nieziemionymi stykami;

P2 - czujnik otrzymany z maską z poliwęglanu i z nieziemionymi stykami;

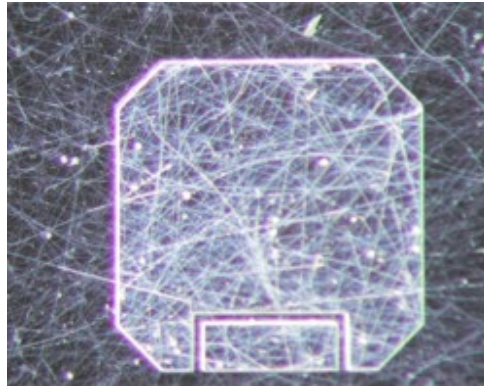
P3 - czujnik otrzymany z maską z poliwęglanu i z uziemionymi stykami.

Dla porównania wykorzystano także czujnik platynowy, oznaczony dalej symbolem Pt, z powierzchnią czystą, tj. bez nanowłókien. Każdy czujnik był testowany metodą woltamperometrii cyklicznej w roztworze 0,1 M KCl, z zakresem potencjałów od -0,6 do 0,8 V, szybkość zmiany potencjału 50 mV/s. Jako elektrodę odniesienia użyto nasyconą elektrodę kalomelową, elektrodą pomocniczą był pręt platynowy. W każdym przypadku wykonano siedem pomiarów:

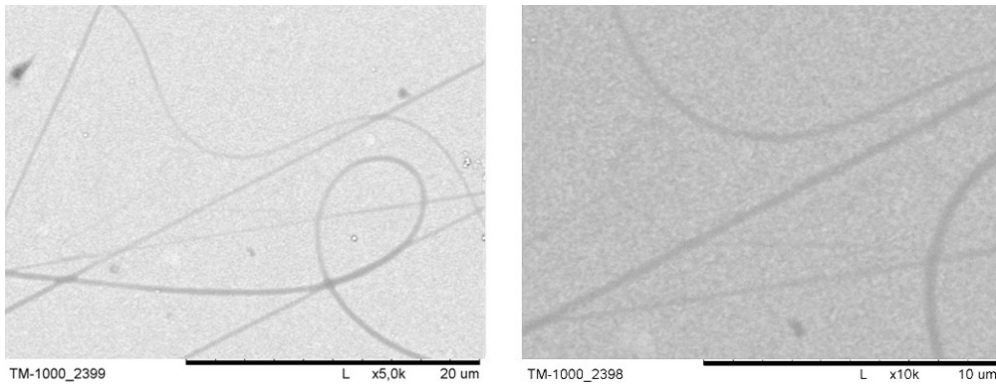
- pomiary oznaczone jako „...CV 1...”, „...CV 2...” i „...CV 3...” były wykonane bezpośrednio po zanurzeniu czujnika w roztworze elektrolitu;
- pomiary oznaczone jako „...CV 4...”, „...CV 5...” i „...CV 6...” były wykonane po zanurzeniu czujnika w roztworze elektrolitu na 40 minut;
- pomiary oznaczone jako „...CV 7...” były wykonane po zanurzeniu czujnika w roztworze elektrolitu na kolejne 60 minut.

Poniżej dla każdego badanego czujnika przedstawiono zdjęcia z mikroskopu optycznego i z mikroskopu elektronowego oraz wyniki pomiarów woltaperometrycznych.

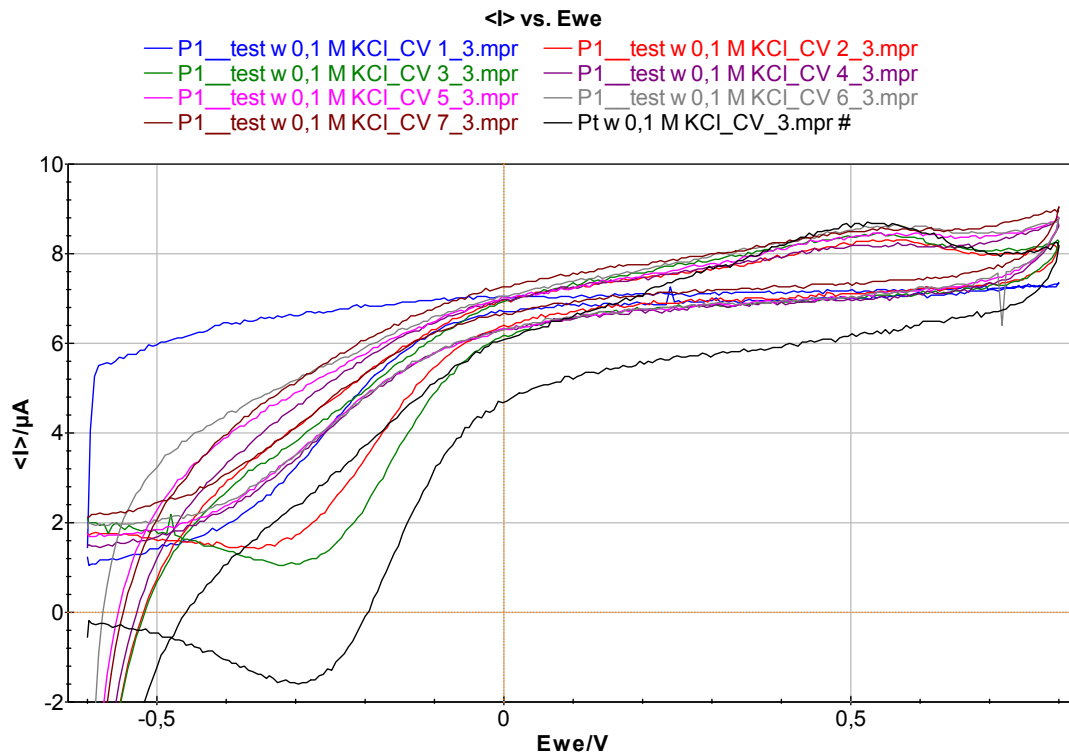
Czujnik P1



Rys. 3-32 Zdjęcia czujnika P1 pod mikroskopem optycznym.

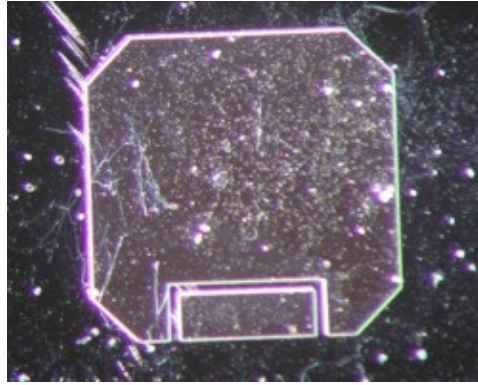


Rys. 3-33 Zdjęcia z mikroskopu elektronowego, powiększenia x5k i x10k. Widoczne pojedyncze nanowłókna.

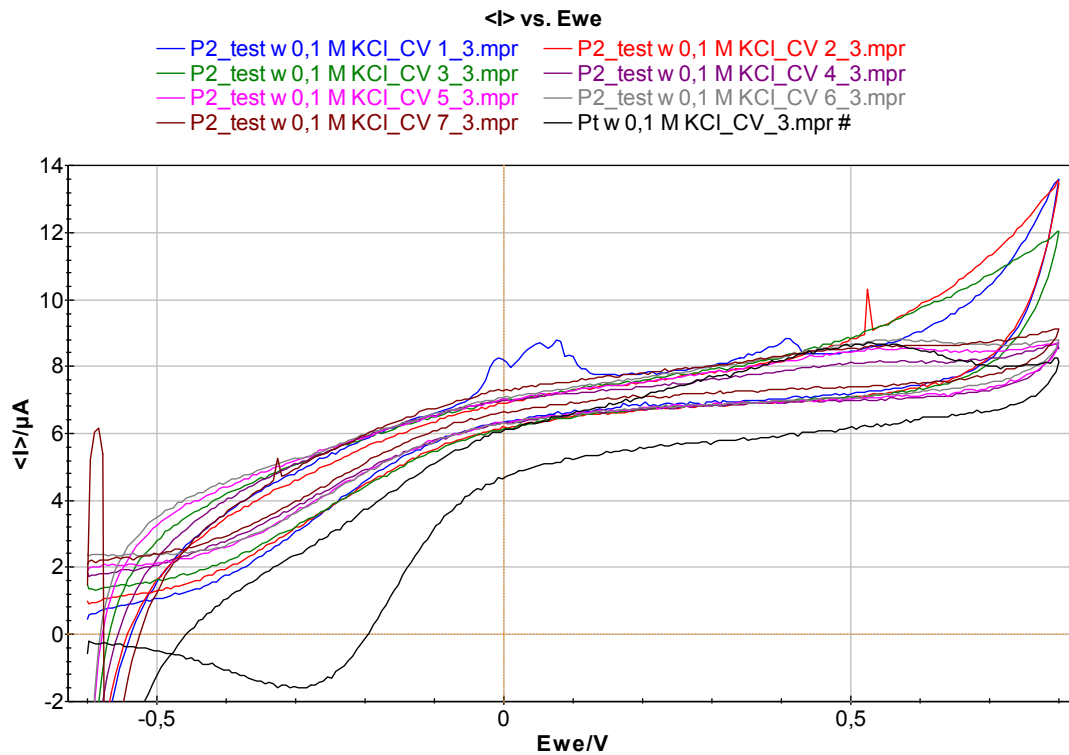


Rys. 3-34 Wyniki testów czujnika P1.

Czujnik P2

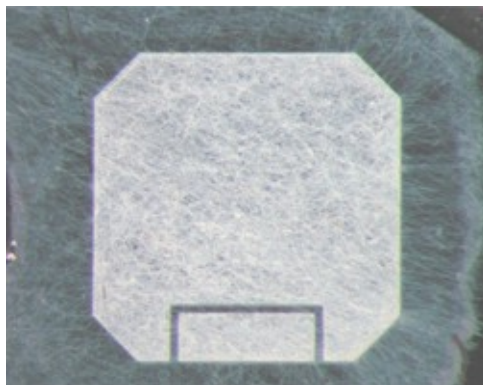


Rys. 3-35 Zdjęcia czujnika P2 pod mikroskopem optycznym.

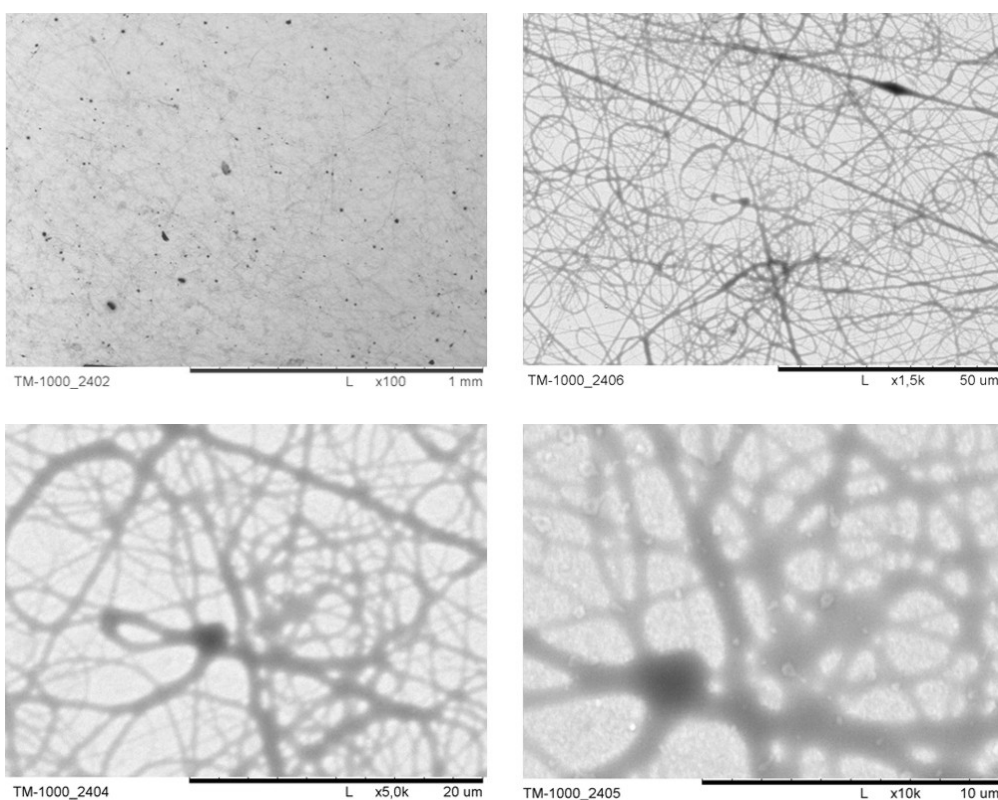


Rys. 3-36 Wyniki testów czujnika P2.

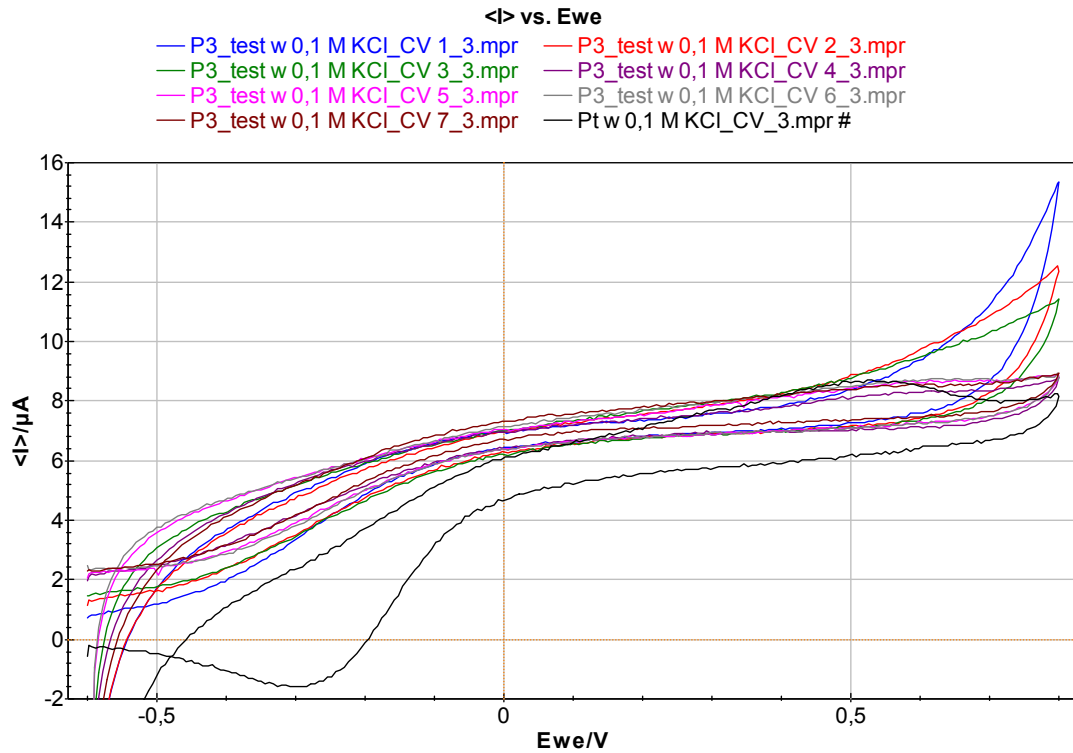
Czujnik P3



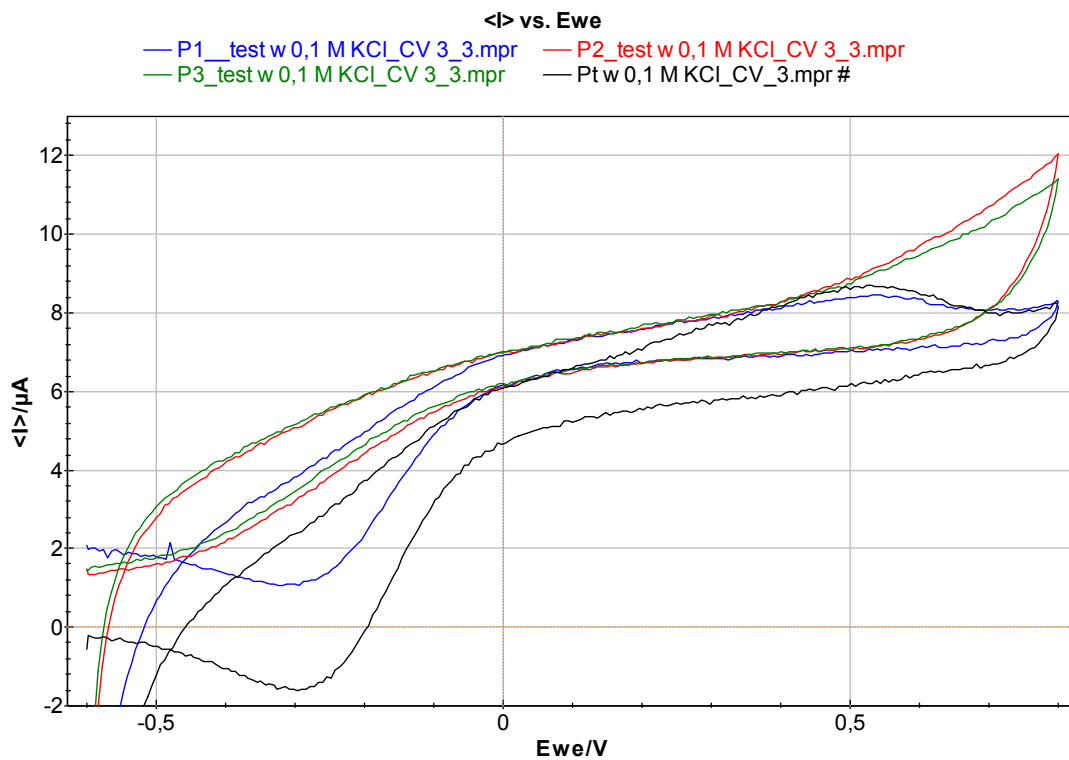
Rys. 3-37 Zdjęcia czujnika P3 pod mikroskopem optycznym.



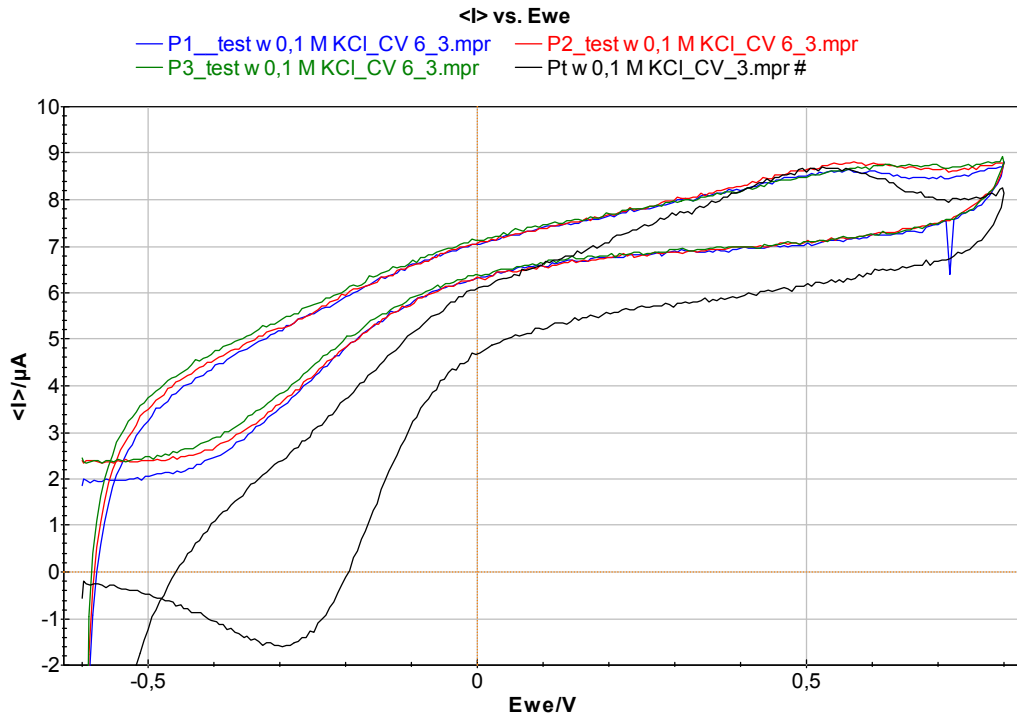
Rys. 3-38 Zdjęcia z mikroskopu elektronowego, powiększenia x100, x1500, x5k i x10k. Widoczna sieć nanowłókien gęstsza niż w przypadku czujnika P1.



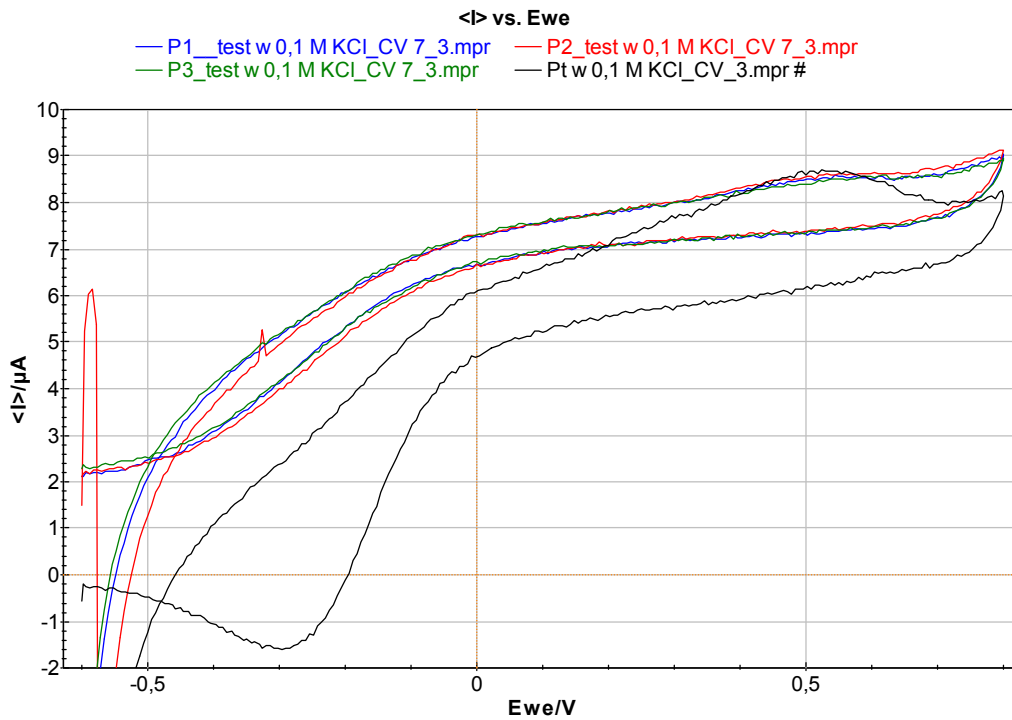
Rys. 3-39 Porównanie czujników P1, P2 i P3 i czujnika Pt.



Rys. 3-40 Testy wykonane bezpośrednio po zanurzeniu czujników w roztworze elektrolitu.



Rys. 3-41 Testy wykonane po zanurzeniu czujników w roztworze elektrolitu na 40 minut.



Rys. 3-42 Testy wykonane po zanurzeniu czujników w roztworze elektrolitu na kolejne 60 minut.

Podsumowanie

Przy wybranych parametrach osadzania warstw polianiliny nie jest widoczny wpływ osadzonych warstw na parametry czujników amperometrycznych z elektrodą platynową. Niewidoczne jest też zróżnicowanie tych parametrów między czujnikami po dłuższym czasie kondycjonowania czujników w roztworze elektrolitu - krzywe woltamperometryczne (CV) są zbliżone (Rys. 3-42).

Wydaje się, że uzyskane warstwy polianiliny są transparentne z elektrochemicznego punktu widzenia. Prawdopodobnie zmianę parametrów elektrochemicznych można by uzyskać poprzez zagęszczenie warstwy nanowłókien.

Czujniki z pogrubioną warstwą nanowłókien

Poniżej omówiono wyniki uzyskane dla czujników z pogrubioną warstwą (o zwiększonej gęstości) nanowłókien nanoszonych w czasie 5 minut przy prędkości podawania roztworu 0.2ml/godzinę i napięciu 10 kV. Do elektroprzędzenia użyto roztworu polianiliny ($M_w \sim 50\,000$ Da, Aldrich) w formie emeraldyny, którą protonowano kwasem dodecylobenzenosulfonowym (DBSA, Acros) w mieszaninie z poli(3-hydromaślanem), PHB, użytym w stężeniu 1,5% w mieszaninie rozpuszczalników 12% chloroform i 88% 2,2,2-trifluoroetanol. Badane czujniki, oznaczone dalej symbolami P4 i P5, pokryte z różnymi warstwami polianiliny, otrzymano w różny sposób:

P4 - jednoelektrodowy czujnik otrzymany z maską z poliwęglanu i z uziemionymi stykami;

P5 – M34A czteroelektrodowy czujnik otrzymany z maską z poliwęglanu i z uziemionymi stykami.

Każdy czujnik był przetestowany metodą woltamperometrii cyklicznej w roztworze 0,1 M KCl z zakresem potencjałów od -0,6 do 0,8 V. Zastosowana szybkość zmiany potencjału wynosiła 50 mV/s. Jako elektrodę odniesienia użyto nasyconą elektrodę kalomelową, a elektrodą pomocniczą był pręt platynowy.

W każdym przypadku wykonano 7 pomiarów:

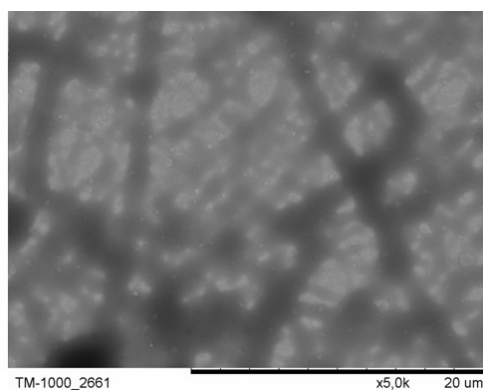
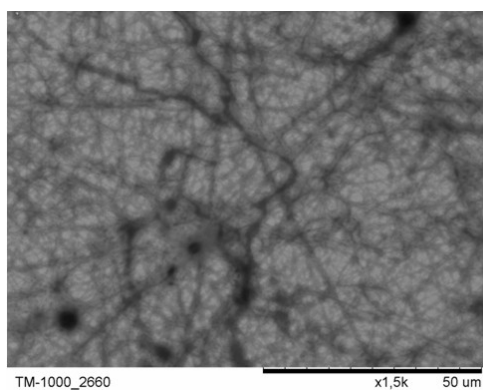
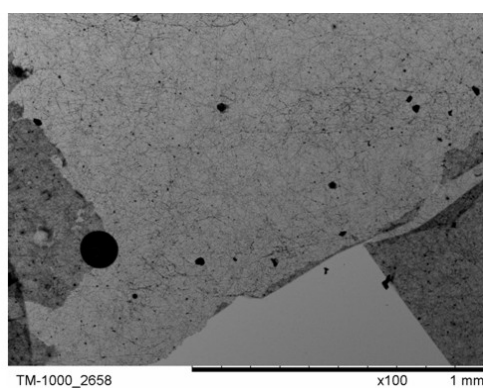
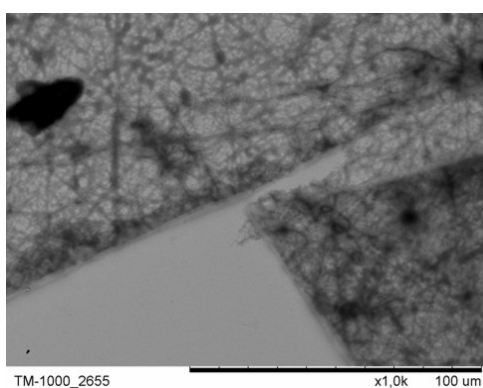
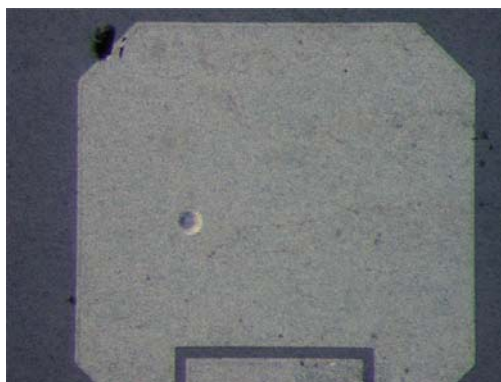
- pomiary oznaczone jako „...CV 1...”, „...CV 2...” i „...CV 3...” były wykonane bezpośrednio po zanurzeniu czujnika w roztworze elektrolitu;

- pomiary oznaczone jako „...CV 4...”, „...CV 5...” i „...CV 6...” były wykonane po zanurzeniu czujnika w roztworze elektrolitu na 40 minut;

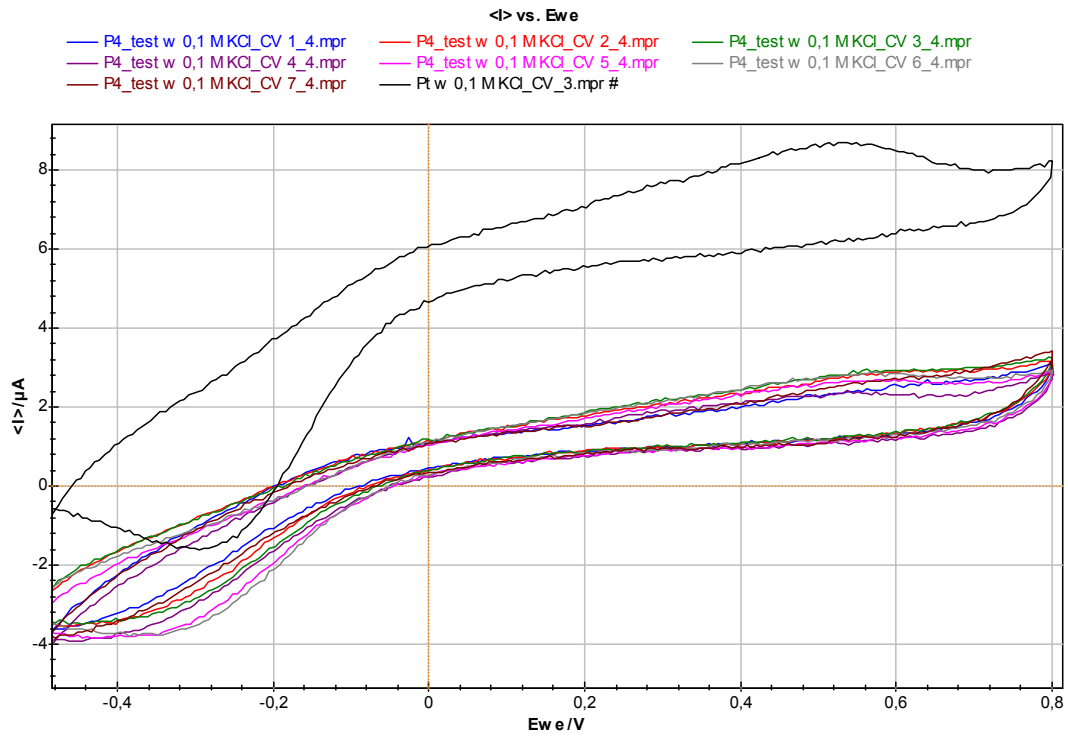
- pomiary oznaczone jako „...CV 7...” były wykonane po zanurzeniu czujnika w roztworze elektrolitu na kolejne 60 minut.

Poniżej przedstawiono dla każdego czujnika zdjęcia z mikroskopu optycznego oraz z mikroskopu elektronowego, a także wyniki pomiarów woltaperometrycznych.

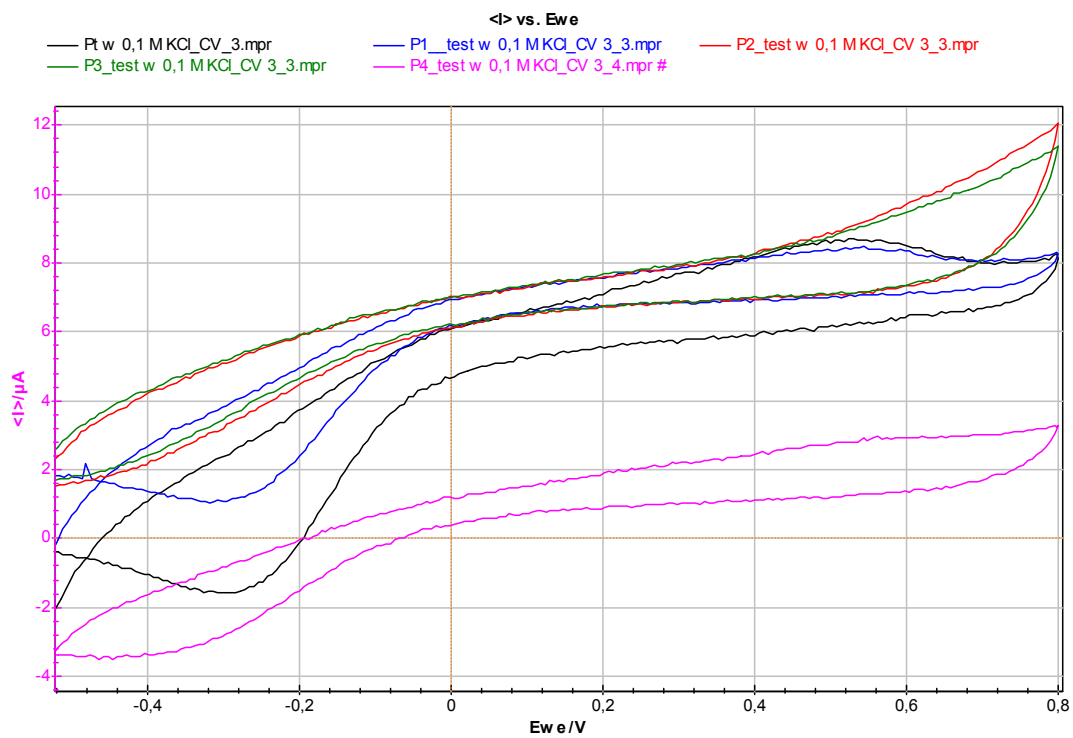
Czujnik jednoelektrodowy P4



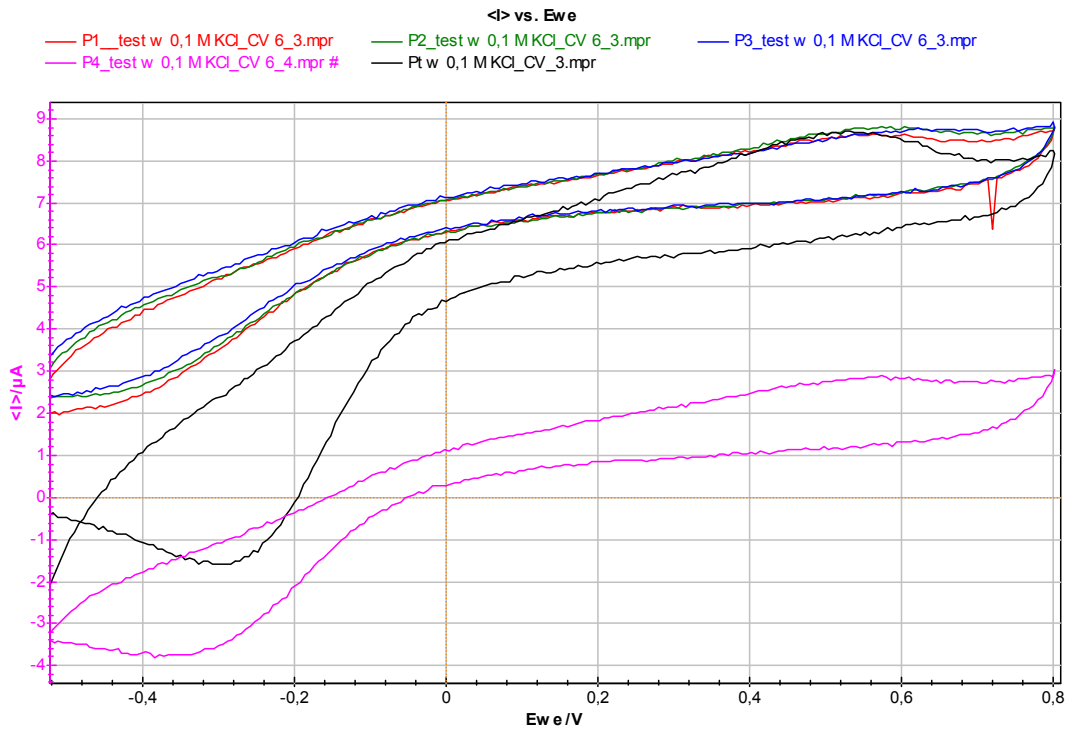
Rys. 3-43 Obrazy mikroskopowe czujnika P4.



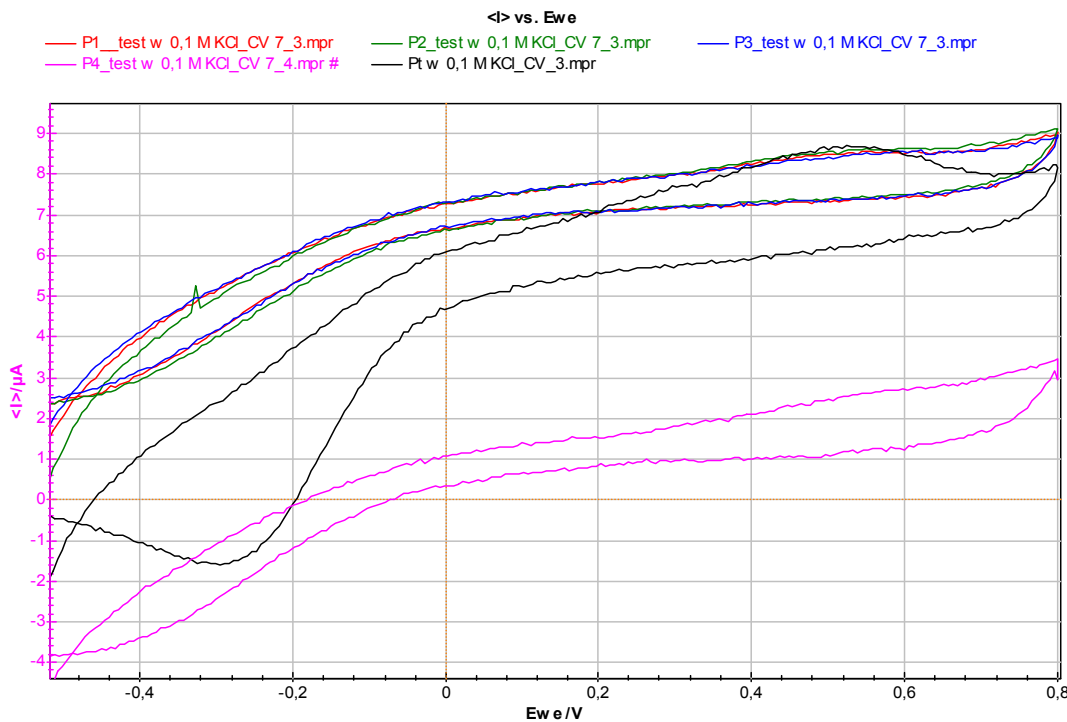
Rys. 3-44 Wyniki testów czujnika P4.



Rys. 3-45 Porównanie czujników serii 1 (P1, P2 i P3) i czujnika z serii 2 – P4.

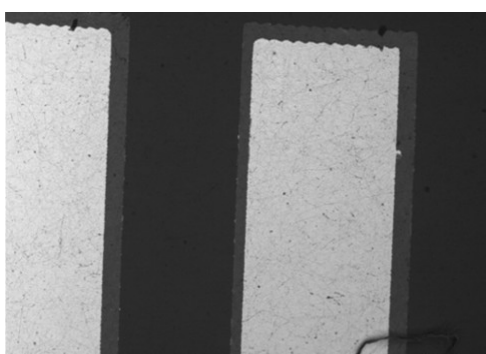
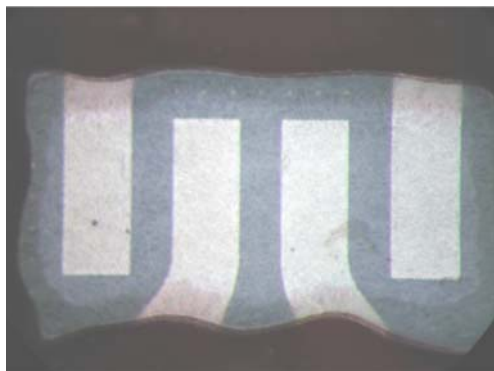


Rys. 3-46 Porównanie czujników serii 1 (P1, P2 i P3) i czujnika z serii 2 – P4.



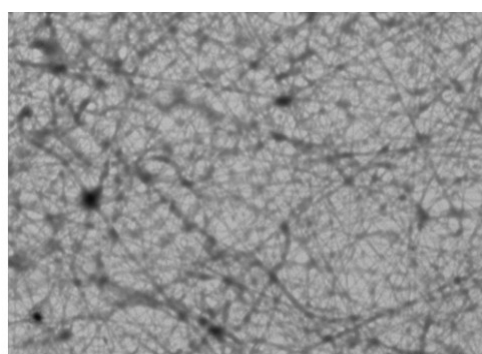
Rys. 3-47 Porównanie czujników serii 1 (P1, P2 i P3) i czujnika z serii 2 – P4.

Czujnik P5 – M34 czteroelektrodowy (A, B, C i D)



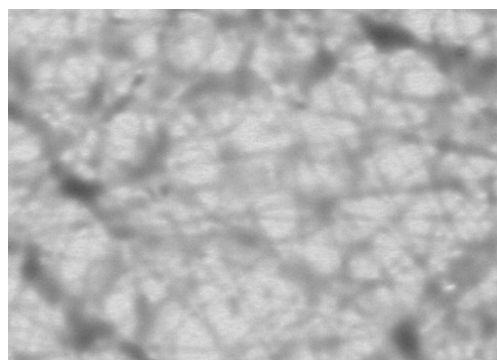
TM-1000_2663

x100 1 mm



TM-1000_2666

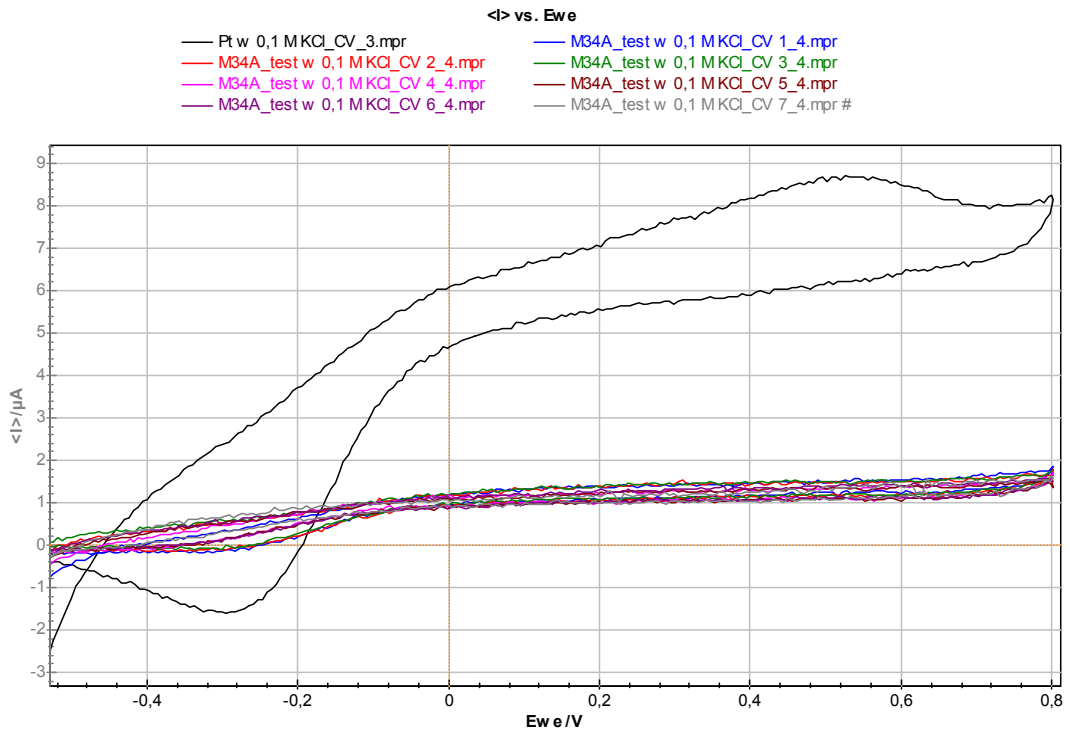
x1,5k 50 um



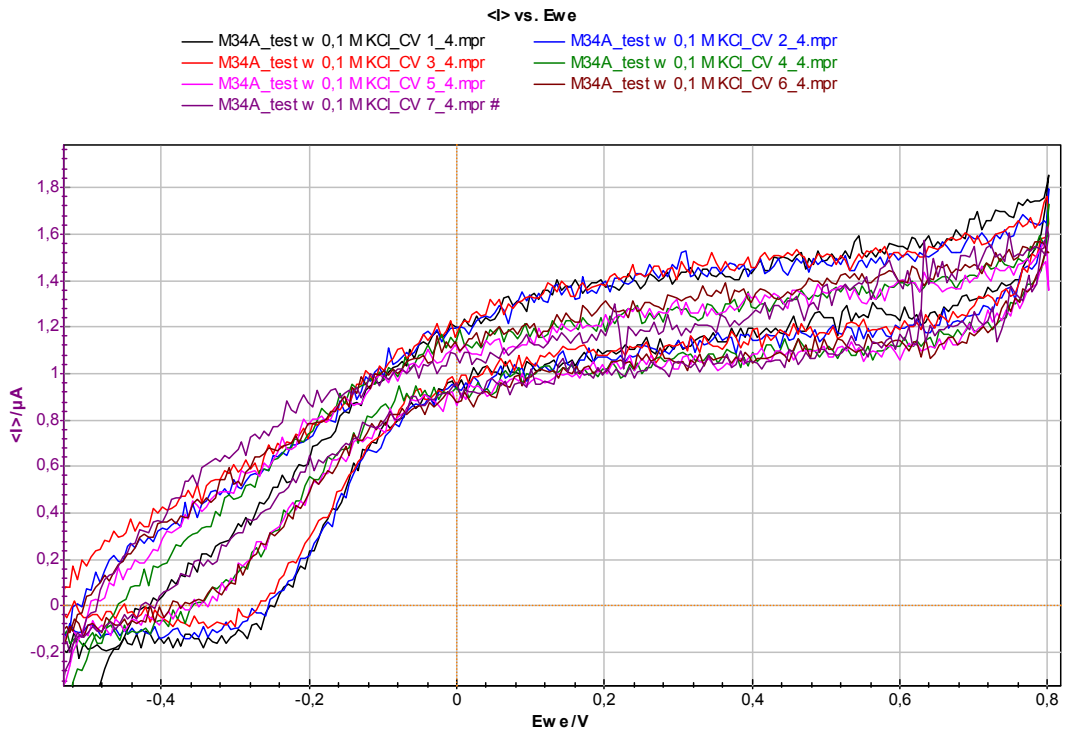
TM-1000_2667

x5,0k 20 um

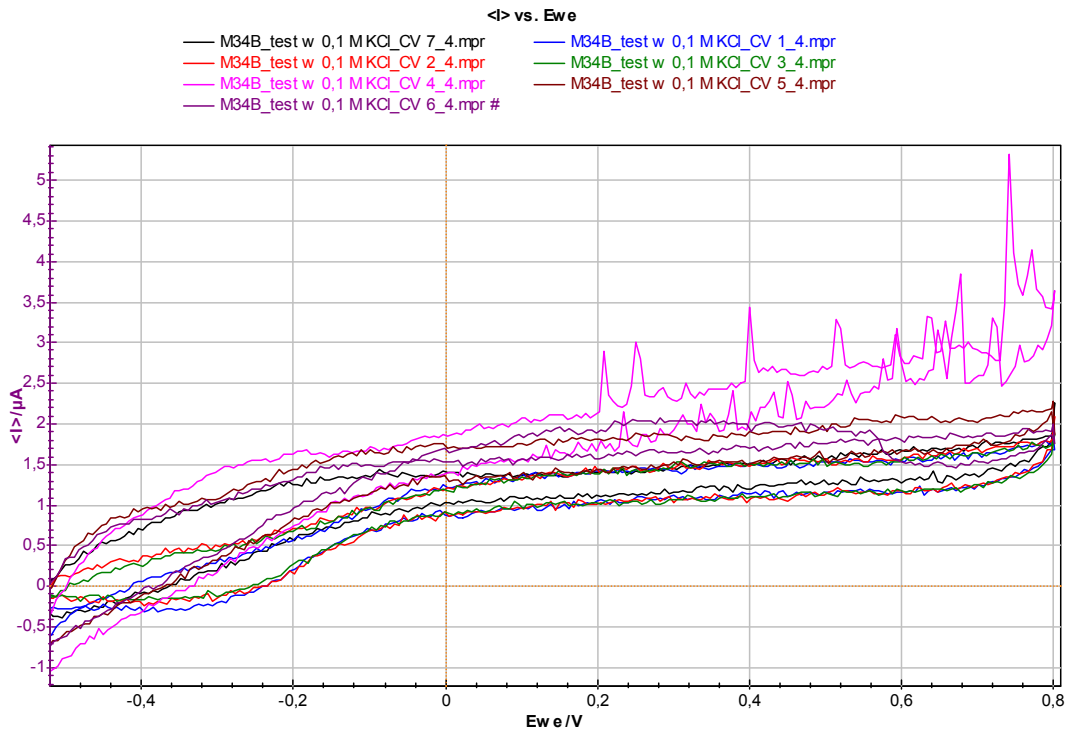
Rys. 3-48 Obrazy mikroskopowe czujnika P5.



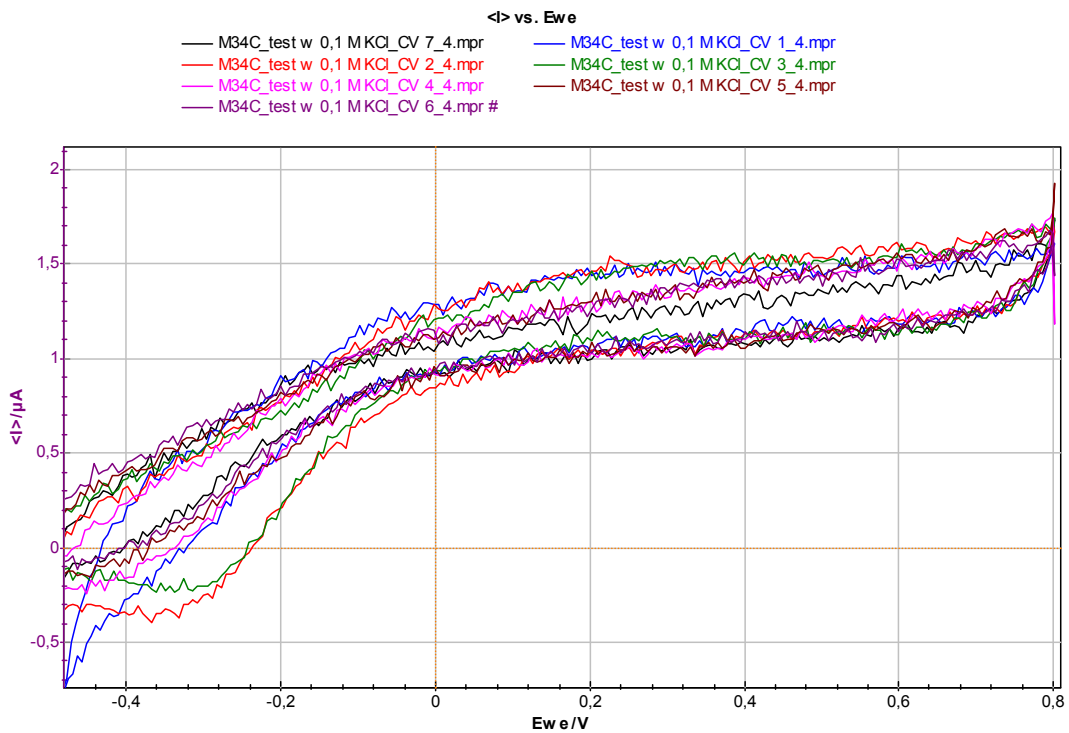
Rys. 3-49



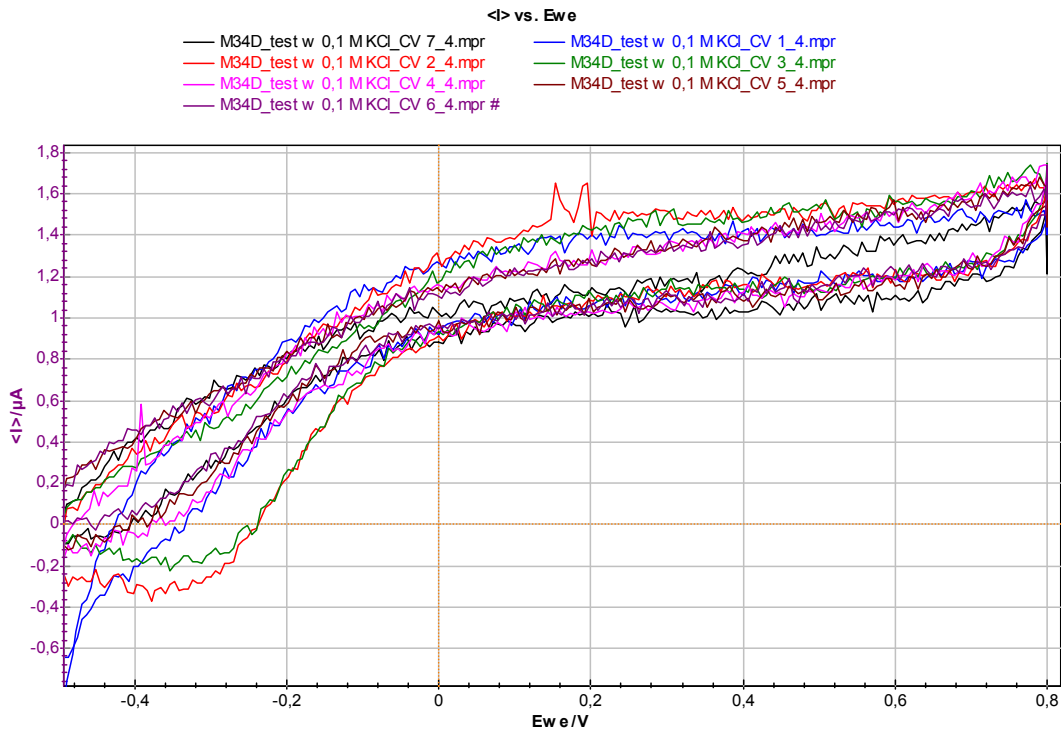
Rys. 3-50



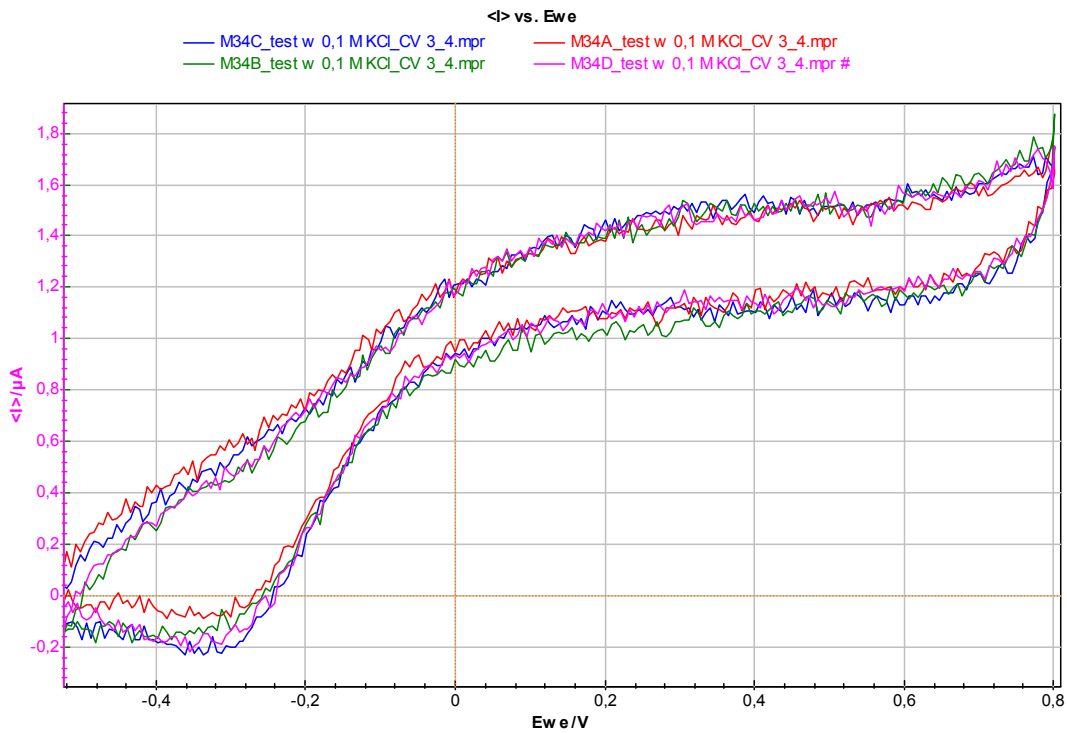
Rys. 3-51



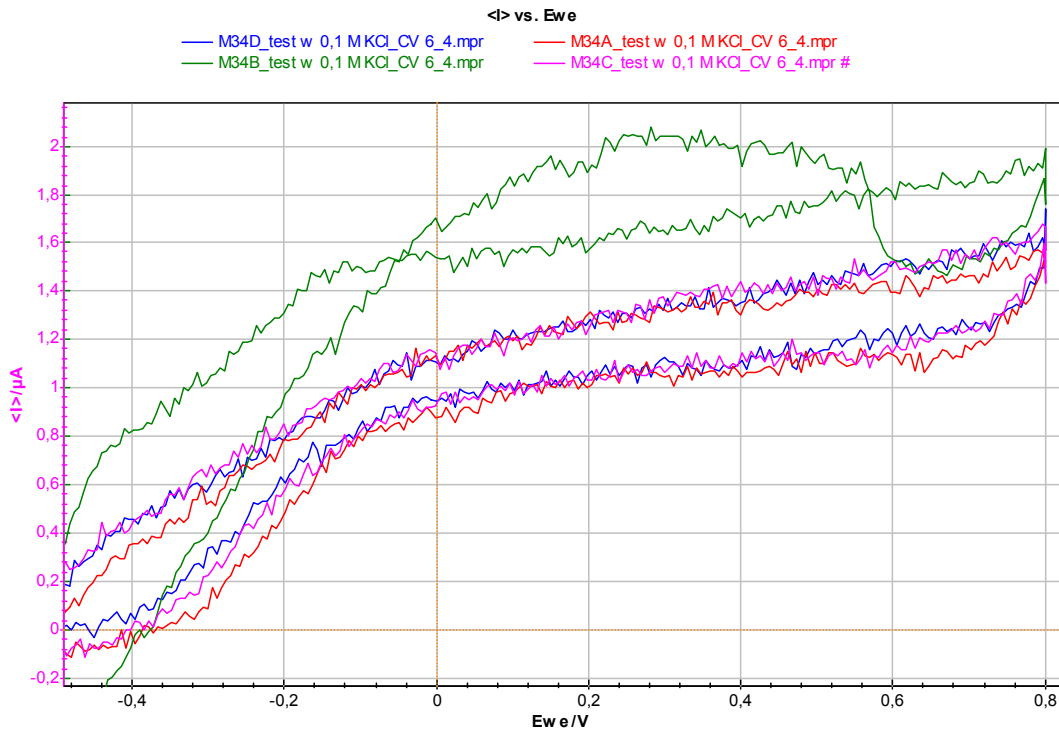
Rys. 3-52



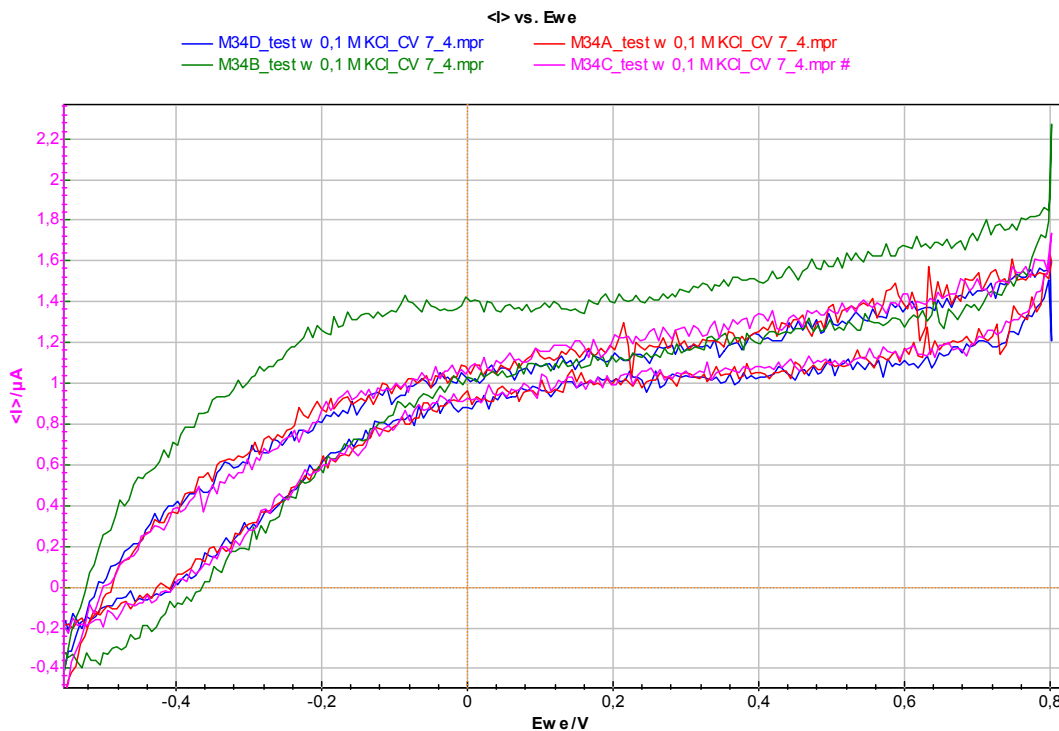
Rys. 3-53



Rys. 3-54 Porównanie elektrod (A, B, C i D) czujnika M34 w kolejnych pomiarach.



Rys. 3-55



Rys. 3-56

Podsumowanie

W przypadku obydwu czujników, warstwy polianiliny spowodowały obniżenie pików prądu zarówno w porównaniu z poprzednimi czujnikami (seria 1: P1 - P3), jak i samą platyną (Pt). Obniżenie prądu względem platyny świadczy o właściwościach izolacyjnych badanych warstw. Wyniki świadczą, że polianilina w nanowłóknach nie tworzyła fazy ciągłej – doszło do separacji faz.

4 Hodowla kultur tkankowych

Hodowla kultur tkankowych jest pierwszym etapem do zastosowania nanowłókien, jako systemów biomedycznych. Realizacja tego zadania stała się głównym przedmiotem badań w projekcie i przyniosła najciekawsze rezultaty, których owocem są: nowe kierunki badań, zapoczątkowanie współpracy z innymi ośrodkami w kraju i za granicą (Wielka Brytania i Hiszpania), a także wystąpienia konferencyjne i artykuły w renomowanych czasopismach.

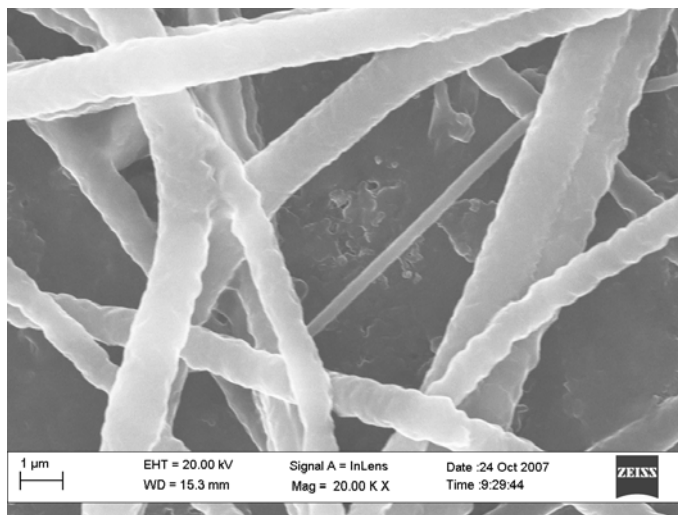
4.1 Wprowadzenie nanoporowatości do włókien

Celem kolejnego zadania przy realizacji projektu było określenie metody wprowadzenia porowatości do nanowłókien, by w ten sposób zapewnić/ułatwić efektywność i wykorzystania w zastosowaniach biomedycznych. Uważa się, że porowatość jest warunkiem sukcesu jest możliwość kolonizacji i wzrostu komórek na rusztowaniu stworzonym z nanowłókien. Przeprowadzono dwa rodzaje eksperymentów różniące się metodą otrzymywania porowatości. W pierwszej metodzie porowatość starano się uzyskać poprzez wypłukiwanie części materiału, w drugiej poprzez zastosowanie lotnego rozpuszczalnika i elektroprzedzenie w podwyższonej temperaturze.

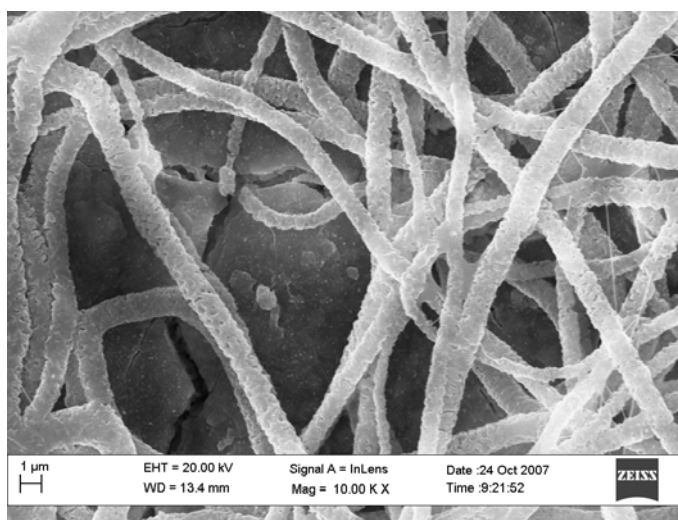
4.1.1 Porowatości uzyskiwana przez wypłukiwanie składnika

W trakcie badań roztwór do elektroprzędzenia wykonano z 90 mg poli(kaprolaktonu) PCL $M_n=65,000$ Da (Aldrich) i 90 mg poli(tlenku etylenu) PEO, $4 \cdot 10^5$ Da (Aldrich), rozpuszczonych w 5,8 g chloroformu $CHCl_3$ (POCH). Całkowite stężenie polimerów wyniosło 2,5%, PCL i PEO użyte były w proporcji 50:50%wag, stężenie każdego polimeru wyniosło 1,25%, odległość dysza-kolektor 15cm, napięcie 10kV, wydatek 0.5ml/h. Jako targetu użyto pastylek z ceramicznego materiału Bioglass, o średnicy 5mm. Próbkę umieszczono w symulowanych warunkach ludzkiego osocza (SBF – simulated body fluid). Już po 3 dniach dobrze zauważalne były nanoporowatości, które powinny ułatwić kolonizację włókien przez osteoblasty (komórki tworzące tkankę kostną).

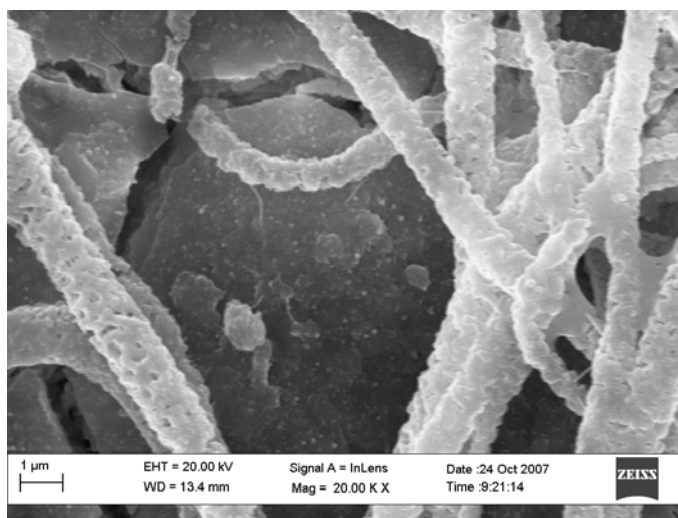
Eksperymenty dokumentowano w formie fotograficznej. Przykładowe zdjęcia (patrz Rys. 4-1, 4-3) prezentowane poniżej pokazują materiał z nanowłókien bez porowatości i materiał porowaty. Zdjęcie oznaczone jako Rys. 4-1 przedstawia włókna uzyskane z mieszaniny polimerów PCL/PEO, a kolejne dwa (Rys. 4-2, 4-3) pokazują ten sam materiał w różnym powiększeniu po wypłukaniu rozpuszczalnego w wodzie PEO. Zgodnie z oczekiwaniem otrzymano strukturę porowatą.



Rys. 4-1 Włókna kompozytowe z PCL/PEO – powiększenie 20 000x.



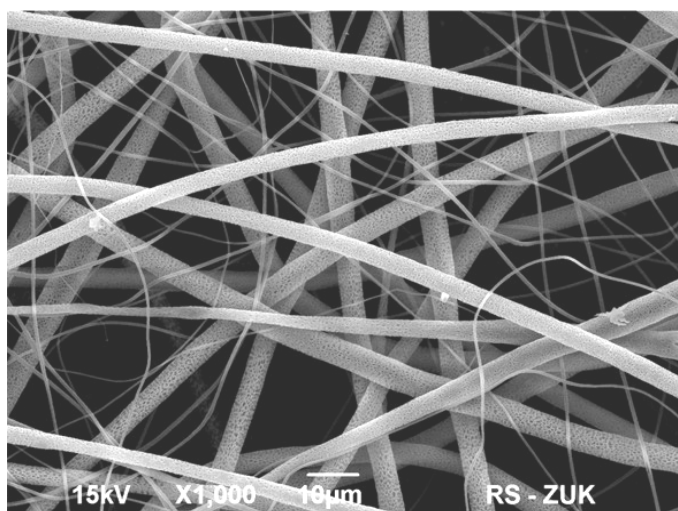
Rys. 4-2 Włókna kompozytowe z PCL/PEO otrzymane po umieszczeniu na 3 dni w płynie o składzie ludzkiego osocza (SBF) – powiększenie 10 000x.



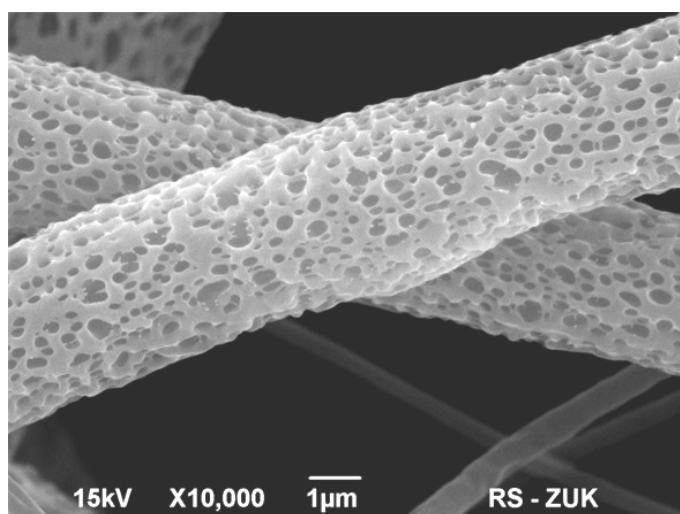
Rys. 4-3 Włókna kompozytowe z PCL/PEO otrzymane po umieszczeniu na 3 dni w płynie o składzie ludzkiego osocza (SBF) – powiększenie 20 000x.

4.1.2 Porowatość uzyskiwana przez odparowanie rozpuszczalnika

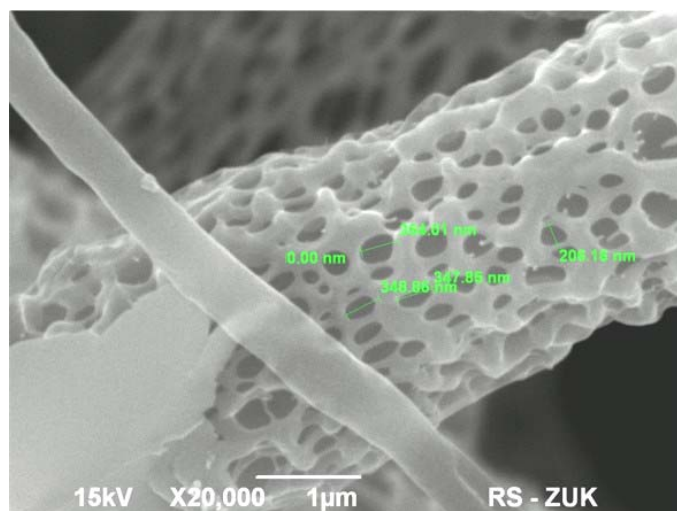
W drugiej metodzie uzyskania porowatego materiału stosowano roztwór do elektroprzędzenia wykonany z 4 g polimeru poli(L-laktydu) PLLA o nazwie Biomer® L900 i średniej wagowej masie cząsteczkowej $M_w=200$ kDa (producent Biomer). Polimer był rozpuszczony w mieszaninie 25 ml chloroformu CHCl_3 i 2,5 g dimetyloformamidu DMF. Stosowano następujące warunki elektroprzędzenia: 8 kV; szybkość podawania roztworu 0,600 ml/h, od strzykawka w odległości 15 cm od powierzchni wody użytej, jako target; czas przędzenia około 45 minut, temperatura zewnętrzna wynosiła 32°C . Należy podkreślić, że temperatura otoczenia, niższa o 29°C od temperatury wrzenia rozpuszczalnika, była bardzo ważnym czynnikiem do uzyskania porowatej morfologii włókien. Dodatkowym czynnikiem, ważnym dla jednorodności materiały, a bez znaczenia dla porowatości, było powolne mieszanie wody. Uzyskano bardzo interesujący materiał o gąbczastej strukturze (Rysunki od 4-4 do 4-7).



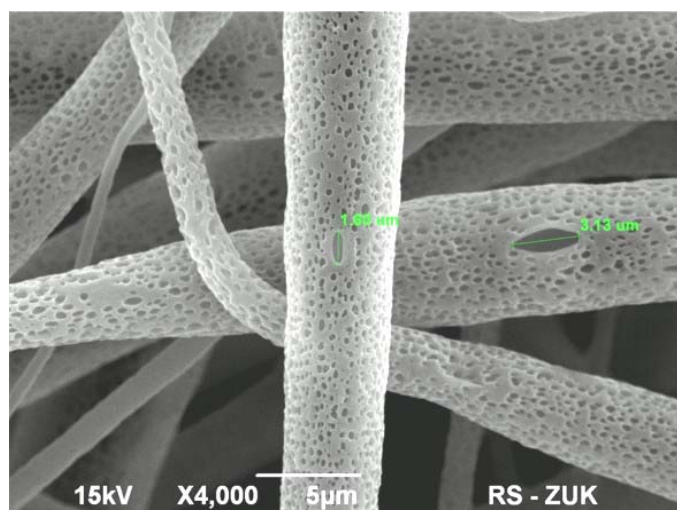
Rys. 4-4 Włókna kompozytowe z PLLA otrzymane metodą elektroprzędzenia. Zauważalna porowata struktura i bidyspersyjność wielkości włókien: $1\mu\text{m}$ i $5\text{-}10\mu\text{m}$ (odpowiednio I i II mod).



Rys. 4-5 Włókna kompozytowe z PLLA otrzymane metodą elektroprzędzenia. Zauważalna gąbczasta struktura i bardzo duża porowatość.



Rys. 4-6 Włókna kompozytowe z PLLA otrzymane metodą elektroprzędzenia. Dla zmierzonych porów wielkość około 350nm, zauważalna obecność mniejszych porów, rzędu 30nm, widoczna gąbczasta struktura. Mniejsze włókno jest dla odmiany pozbawione porów.



Rys. 4-7 Włókna kompozytowe z PLLA otrzymane metodą elektroprzędzenia. Dla zmierzonych większych porów wielkość około 1,6 -3,1μm. Również mniejsze włókna mają strukturę porowatą.

Porównując obraz włókien widoczny na zdjęciach (Rys. 4-4 i 4-5) można wyróżnić bidispersyjny ich charakter: włókna modu I o grubości włókien około 1μm i drugie modu II o grubości 5-10μm. Daje się także zauważyć nanoporowatości o lekko owalnym kształcie tworzący układ o wyraźnej bidispersyjności, niezależnej od grubości włókien. Pierwszy mod porowatości (Rys. 4-6) miał średnią wielkość około 350nm, drugi miał średnią wielkość 1,6-3,1μm (Rys. 4-7). Wydaje się, że gąbczasto-porowata struktura będzie miała krytyczne znaczenie podczas zasiedlania i wzrostu komórek dla rusztowania tkankowego wykonanego z PLLA.

4.2 Elektroprzędzenie białek i zastosowanie nanowłókien jako biosensorów

Kolejnym etapem badań było otrzymanie elektroprzędzonych nanowłókien z użyciem materiałów białkowych i zastosowanie uzyskanych materiałów jako biosensorów. Omawiane tu badania podjęto z uwagi na potencjalne znaczenie zastosowań biomedycznych

elektroprądzenia w praktyce [103]. Wyniki zostały opublikowane przez autorów projektu [52] i załączone do tego opracowania. Do elektroprądzenia stosowano albumine surowicy wołowej (BSA), która jest białkiem globularnym, znacznie trudniejszym do elektroprądzenia niż białka fibrylarne (włókniste). Głównym osiągnięciem tych badań było elektroprądzenie białka w formie natywnej (naturalnej), z roztworu wodnego, bez zastosowania toksycznych rozpuszczalników fluorowanych. Również proces otrzymania włókien nierozpuszczalnych w wodzie odbywał się bez zastosowania odczynników, które denaturują białka (zmieniają ich strukturę). Wykazano, że białko w formie nanowłókien ulega w temperaturze pokojowej w atmosferze powietrza nieodwracalnemu utwardzeniu, co umożliwia użycie go do zastosowań biomedycznych. Nierozpuszczalne włókna z BSA były następnie modyfikowane z zastosowaniem izotiocjanianu fluoresceiny (FITC) w celu uzyskania dwuwymiarowego biosensora czułego na zmiany pH (kwasowości) z rozdzielczością rzędu dziesiątek μm .

Elektroprądzenie w układzie współosiowym jest bardzo wygodną metodą do enkapsulacji (zamykania w materiale) i następnie uwalniania związków bioaktywnych. Zastosowanie nierozpuszczalnego w wodzie materiału powłoki włókna umożliwia zamknięcie w rdzeniu uzyskanego włókna substancji biologicznych takich jak: BSA połączone z FITC [116]. Autorzy cytowanych badań stwierdzili, że elektroprądzenie nie naruszyło struktury białek.

W niniejszej pracy wykonawcy postawili sobie za cel uzyskanie biosensora umożliwiającego nieinwazyjne obrazowanie aktywności żywych komórek z rozdzielczością zbliżoną do cząsteczkowej. Obecnie takie zadanie pełnią funkcjonalizowane nanocząsteczki. Umożliwiają one zbieranie informacji jedynie z bardzo małych obszarów. Nanowłókna mogłyby zaoferować możliwość rozszerzenia tej metody diagnostycznej umożliwiając śledzenie zmian sygnału na całej długości obserwowanego włókna – na długości setek mikrometrów. Białka są dobrymi kandydatami do tworzenia biosensorów, gdyż są zbudowane z biologicznie aktywnych makrocząsteczek, które mogą łatwo zostać umieszczone w środowisku żywych komórek. Unikalne właściwości wiążące białek ułatwiają transport i przyłączanie komórek. Badania zostały ukierunkowane w celu uzyskania protokołu tworzenia nierozpuszczalnych w wodzie nanowłókien z białek globularnych. Zgodnie z wiedzą autorów było to pierwsze doniesienie o próbie uzyskania biosensorów z takiego materiału.

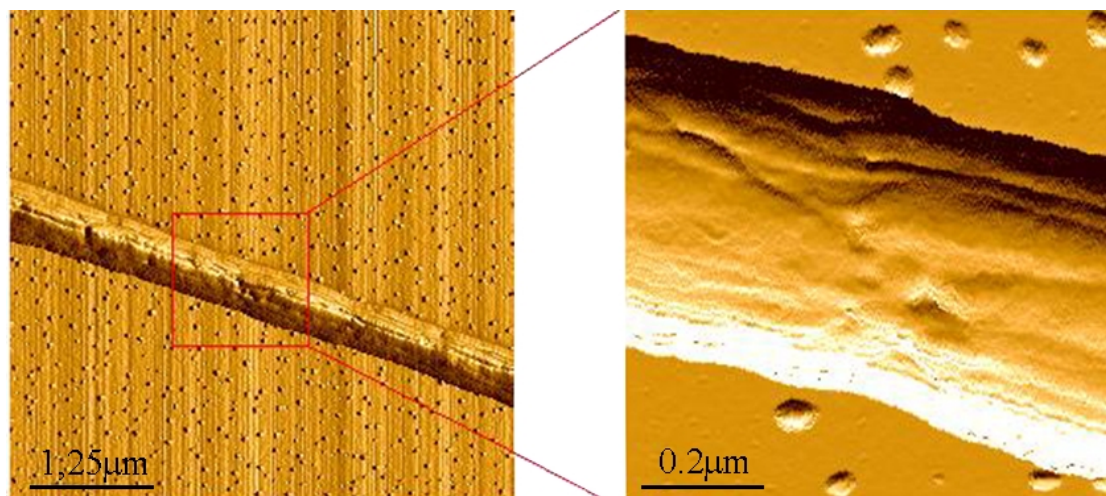
Procedura badawcza

W badaniach użyto BSA (65 000 Da), białka szeroko używanego w zastosowaniach biotechnologicznych jako środek blokujący, składnik pożywki do kultur tkankowych i stabilizator enzymów, poli(tlenek etylenu), PEO (400 000 Da) oraz izotiocjanian fluoresceiny (FITC). Do badań użyto standardowego zestawu do elektroprądzenia.

Wstępne wyniki pokazały, że 2-15% wodne roztwory BSA nie ulegają elektroprądzeniu, niezależnie od użytego potencjału. Na podstawie doniesień literaturowych [10], zastosowano dodatek PEO, który nie tylko umożliwia elektroprądzenie roztworów białek, ale również sam jest biokompatybilny.

Elektroprądzenie optymalizowano dla zmian potencjału 5-30 kV, zmiany proporcji PEO/BSA zmieniano w granicach 0-50%, stężenia składników w roztworze do elektroprądzenia od 7 do 15%, oraz wydatku masowego pompy (dopasowanego do potencjału). Znaleziono optymalne warunki elektroprądzenia to: wydatek masowy 0,2 ml/godzinę, potencjał-15 kV, proporcja składników 85% BSA i 15% PEO, sumaryczne

stężenie składników 8,7%. Eksperymenty prowadzono przy temperaturze zewnętrznej około 22°C i wilgotności względnej około 30%.

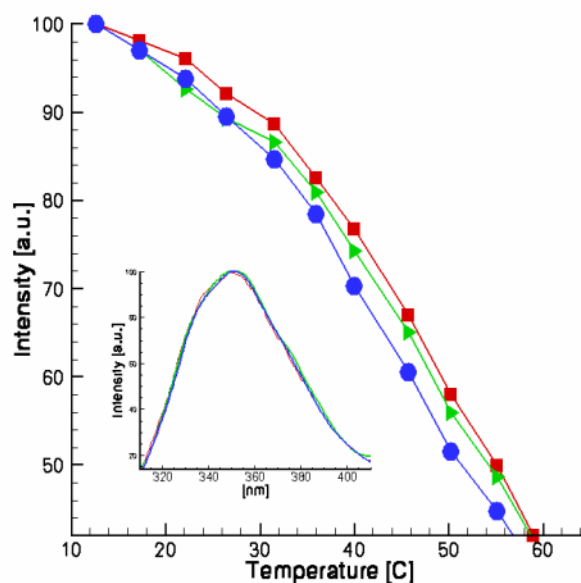


Rys. 4-8 Otrzymany z mikroskopu sił atomowych (AFM) obraz struktury elektroprzędzonych włókien z BSA/PEO.

Geometrię otrzymanych nanowłókien oceniano z zastosowaniem mikroskopu optycznego, zaś właściwe obserwacje i pomiary grubości nanowłókien prowadzono z użyciem mikroskopu sił atomowych (AFM). Rysunek 4-8 pokazuje obraz kompozytowego włókna z BSA/PEO. Rozmiar poprzeczny uzyskanych włókien osiągał wartość rzędu setek nanometrów, zaś same włókna nie miały przekroju kołowego-przypominał wstążkę o grubości 73nm i szerokości 400 nm. Przyczyną takiego kształtu przekroju włókien mogła być sytuacja, w której tworzące się włókno zestało się na powierzchni, a następnie zapadało po wycieknięciu pozostałych składników strugi [31], pod wpływem oddziaływań elektrostatycznych i sił powierzchniowych (van der Waalsa). Wiele spośród analizowanych włókien miało stosunek wysokości do szerokości rzędu 1:10. Nie przeprowadzono jednak badań, które potwierdziłyby, czy struktura wstążki jest typowa dla włókien otrzymanych w procesie elektroprzędzenia.

Charakteryzacja elektroprzędzonych włókien z BSA/PEO.

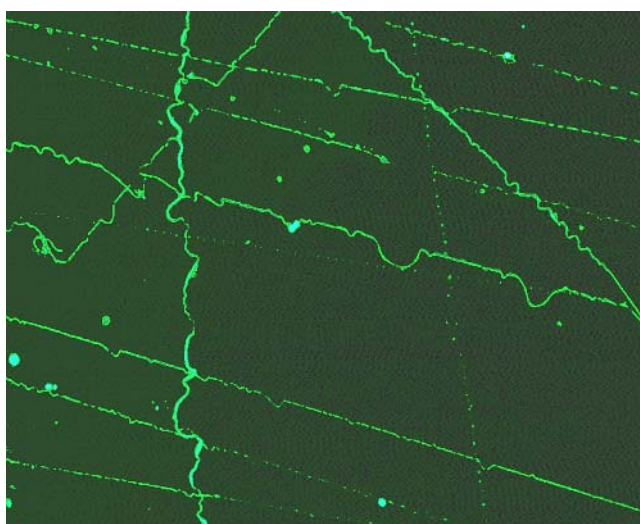
Tworzeniu nanowłókien z białek w postaci natywnej z użyciem techniki elektroprzędzenia towarzyszą stosunkowo duże siły elektrostatyczne i mechaniczne. Mogą one uszkodzić materiał biologiczny zmieniając jego aktywność lub nawet prowadzić do denaturacji. Aby wykluczyć możliwość takiego uszkodzenia świeżo przygotowane elektroprzędzone włókna białkowe rozpuszczano w wodzie i porównywano z roztworami natywnego, nie przędzonego BSA. Do analizy zastosowano elektroforezę oraz fluorescencję. Elektroforeza w warunkach niedenaturujących pokazała identyczność BSA przed i po elektroprzędzeniu, co oznacza, że czwartorzędowa struktura białka nie została znacząco zmieniona. W drugim teście określono wpływ elektroprzędzenia na fluorescencję (przy długości fali 348nm) aromatycznych aminokwasów zawartych w białku. Zmierzono również profile denaturacji dla natywnego BSA, dla elektroprzędzonego BSA, a końcu dla mieszaniny BSA i PEO. Ta ostatnia nie była elektroprzędzona. Wyniki zamieszczone na Rys. 4-9 pokazują, że nie ma różnic profili denaturacji i widm emisyjnych fluorescencji. Dowodzi to, że elektroprzędzenie nie powoduje denaturacji BSA.



Rys.4-9 Temperaturowe profile denaturacji natywnej albuminy (kwadraty), oraz mieszaniny BSA/PEO przed (kółka) i po elektroprzędzeniu (trójkąty) mierzone przez fluorescencję aminokwasu tryptofanu (składnika BSA). Rysunek wewnątrz pokazuje nałożone widma emisji tryptofanu uzyskane dla wszystkich trzech próbek.

Uzyskanie nierozpuszczalnych włókien z albuminy

Świeżo otrzymane włókna z BSA/PEO były łatwo rozpuszczalne zarówno w wodzie, jak i w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4). Stwierdzono, że proces rozpuszczania siatki z włókien naniesionych na szkiełko nakrywkowe trwa kilka sekund. Włókna przechowywane w warunkach pokojowych przez 2 tygodnie stawały się nierozpuszczalne w wodzie i pozostawały przyklejone do szkiełka, na którym je zebrano. Obserwacje mikroskopowe pokazały, że geometria włókien nie uległa zmianie, a prowadzone przez 2 tygodnie próby rozpuszczenia włókien w warunkach fizjologicznych (roztwór PBS o pH 7,4 w temperaturze 37°C) i monitorowanie fluorescencji pokazały, że BSA nie wypłukuje się. Włókna były wystarczająco stabilne do użytku np., jako sondy diagnostyczne.

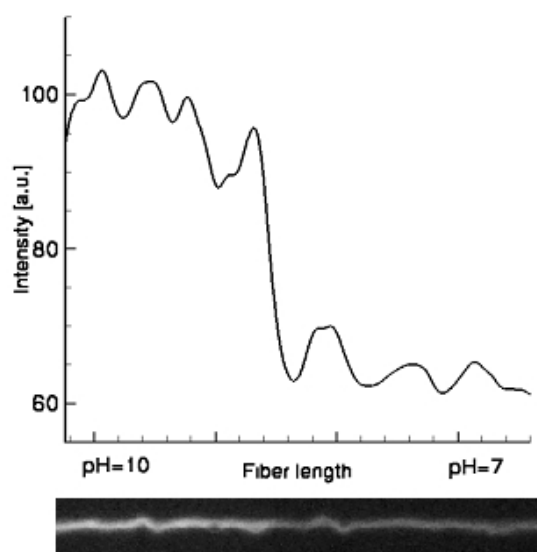


Rys. 4-10 Nanowłókna z elektroprzędzonego BSA wybarwionego FITC obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym. Szerokość obrazu 0,18mm.

Dla uzyskania fluorescencyjnego biosensora z utwardzonych włókien najpierw pozostawiono je w 0.02% roztworze FITC na 24 godziny, a następnie wielokrotnie przepłukiwano wodą dejonizowaną dla wymycia pozostałości barwnika. Rysunek 4-10 pokazuje widok wybarwionych fluorescencyjnie włókien BSA-FITC pod mikroskopem fluorescencyjnym. Ocenia się, że podczas przebywania w wodzie i wielokrotnego przemywania rozpuszczalny składnik włókna – PEO – uległ wypłukaniu i pozostawił nierozpuszczalne włókna z BSA wybarwionego FITC.

Fluorescencyjne włókna białkowe mogą być użyte do wizualizacji oddziaływań włókien z materiałem biologicznym w kulturach tkankowych, do obserwacji procesów zachodzących w opatrunkach przykrywających rany, jak również do konstrukcji fluorescencyjnych nanosensorów. Jednym z możliwych ich zastosowań jest konstrukcja kontaktów FRET (transfer energii fluorescencji przez rezonans) przez elektroprzędzenie komplementarnie wybarwionych włókien na podłożu szklanym. Obserwacja tak otrzymanych materiałów pod mikroskopem fluorescencyjnym umożliwia wybranie przecięć włókien, tworzących kontakt FRET. Bardzo mały obszar kontaktu dwóch materiałów fluorescencyjnych jest bardzo wrażliwy na zmiany otoczenia chemicznego tworząc nano-czujnik chemiczny. Eksperymenty potwierdziły potencjalną możliwość takiego zastosowania włókien fluorescencyjnych.

Obserwacja wewnątrzcząsteczkowych zmian pH w żywych komórkach jest bardzo ważna i może być dokonywana z użyciem wrażliwego na ten parametr czujnika fluorescencyjnego. Wykres na rysunku 4-11 pokazuje, że potrzebnym czujnikiem mogą być nanowłókna z BSA-FITC. Widoczna zależność została sporządzona na podstawie umieszczone pod nią zdjęcia nanowłókna obserwowanego z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego. Podczas eksperymentu lewa jego część zanurzona była w alkalicznym buforze o pH 10, zaś prawa strona pozostawała w środowisku o odczynie obojętnym. Na fotografii widać, że intensywność fluorescencji, zmieniająca się wzdłuż włókna, jest wyraźnie większa z lewej strony (dla pH=10). Podobny pomiar, wykonany np. dla włókien przyłączonych do błony komórkowej lub do hodowli komórek, może być użyty do monitorowania ich aktywności biologicznej.



Rys. 4-11 Obserwacja wpływu pH na fluorescencję włókna otrzymanego z BSA-FITC: wykres ilustruje względną zmianę intensywności fluorescencji, zdjęcie włókna pod mikroskopem fluorescencyjnym (szerokość zdjęcia 80 μ m).

Wnioski

Pokazano zastosowanie i optymalizację elektroprzędzenia globularnego, dobrze rozpuszczalnego w wodzie, naturalnie występującego białka – albuminy surowicy wołowej (BSA). Z materiału otrzymano nierozpuszczalne nanowłókna, w których została zachowana struktura natywnego białka. Włókna po wybarwieniu fluorescencyjnym mogą być użyte, jako dwuwymiarowe biosensory, jak również, jako nowe rusztowania do hodowli komórek. Przeprowadzone eksperymenty wskazują na bardzo ważną możliwość zastosowania fluorescencyjnie wybarwionych nanowłókien białkowych do pomiaru wewnątrzcząsteczkowych zmian pH w żywych komórkach.

4.3 Nanowłókna jako biodegradowalne pokrycie implantów kostnych

Kolejnym etapem badań przeprowadzonych w ramach projektu było otrzymywanie siatek pokrywających ceramiczne implanty kostne, wykonanych z elektroprzędzonych nanowłókien. W badaniach starano się otrzymać materiały ceramiczne o zmodyfikowanej powierzchni zapewniającej w ten sposób poprawę biogodności. Pokrycia te miały być również bioaktywne i mieć potencjalną możliwość zastosowania, jako system uwalniania leków.

Strategie inżynierii tkankowej wymagają, aby materiał do hodowli komórek był biodegradowalny. W takim przypadku komórki kultury tkankowej dobrze przylegają do rusztowania i mają ułatwiony wzrost. Generalnie uważa się, że wysoce porowate mikrostruktury o dużej powierzchni stymulują wzrost komórek. Według danych literaturowych regeneracja kości wymaga spełnienia trzech warunków:

1. Rozmiar pojedynczych porów w implancie przynajmniej rzędu 0,1 mm,
2. Trójwymiarowa struktura porowatego materiału zapewniająca połączenia porów,
3. Porowatość materiału co najmniej na poziomie 80% lub więcej [15].

Biodegradowalne i biokompatybilne nanowłókna poliestrowe, uzyskane na drodze elektroprzędzenia, powinny świetnie się nadawać do tworzenia rusztowań tkankowych o wysokiej porowatości. Materiały te mają jednak niewystarczającą wytrzymałość mechaniczną, jako rusztowania używane do odbudowy kości. Dotychczas nie udało się wytworzyć trójwymiarowych struktur na podstawie nanowłókien.

Bioaktywne ceramiki i szkła są bardzo atrakcyjnym materiałem do zastosowania w odbudowie tkanki kostnej, ale mają swoje ograniczenia. Tu istotnym jest brak możliwości wbudowania leków lub czynników wzrostu w ich strukturę. To ograniczenie spowodowane jest procesem otrzymywania ceramiki wymagającym wysokich temperatur, rzędu 1100°C. W celu obejścia powyższych utrudnień do regeneracji kości tworzy się materiały oparte na biodegradowalnych polimerach i bioaktywnych ceramikach. W ten sposób były przykładowo badane bioaktywne i bioresorbowalne materiały typu polimer/Bioglass, o odpowiednio dobranej wielkości porów, oraz rusztowania ze szklistej ceramiki, pokrytej warstwą biodegradowalnego polimeru.

Badania wykonano we współpracy z grupą twórcy materiału Bioglass, Aldo Boccaccinim [15] z Imperial College (UK). Pomysłem wykonawców projektu było użycie porowatej siatki z nanowłókien poliestru pokrywającej ceramikę, by ten sposób zastąpić dotychczas stosowaną litą warstwę poliestru. Siatka taka naśladowałaby strukturę zewnątrzcząsteczkowej matrycy kolagenu (ECM) i mogłaby ulegać mineralizacji, podobnie jak włókna kolagenu uczestniczące w budowie kości. Innym zastosowaniem siatki z nanowłókien byłoby użycie jej, jako systemu uwalniania leku. Także w tym przypadku dotychczas stosowano lite warstwy polimeru. Realizacja pomysłu jest pierwszą tego typu próbą zakończoną sukcesem.

W ramach badań otrzymywano porowatą ceramikę, którą następnie pokrywano warstwą nanowłókien. Testowane materiały to:

- poli(3-hydroksymaślan), PHB,
- kopolimer poli(3-hydroksymaślan-co-hydroksywalerianian), PHBV,
- kompozyt poli(kaprolaktonu),PCL: poli(tlenek etylenu), PEO, proporcja PCL/PEO= 1:1.

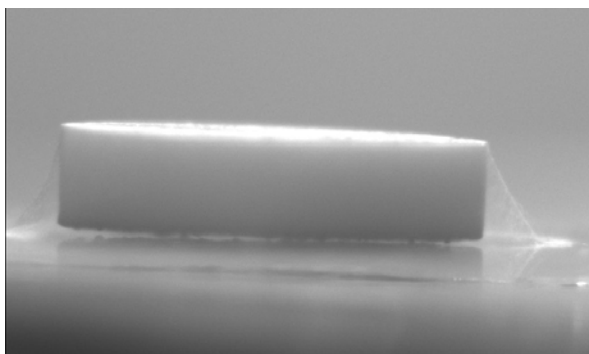
Pierwszy z wymienionych materiałów (PHB) jest biodegradowalnym i biosyntezywalnym polimerem, który dotychczas był szeroko stosowany do implantów kości ze względu na swoje właściwości piezoelektryczne, obserwowane w kościach. Drugi materiał (PHBV) ma strukturę prawie identyczną, jak PHB, przy czym jego zaletą jest, że 2% zawartość jednostek hydroksywalerianianu zmniejsza kruchość. Ostatni z badanych materiałów (PCL) odznacza się znacznie dłuższym niż PHB czasem biodegradacji, co czyni go cennym do zastosowania jako system uwalniania leków.

Rezultaty i dyskusja

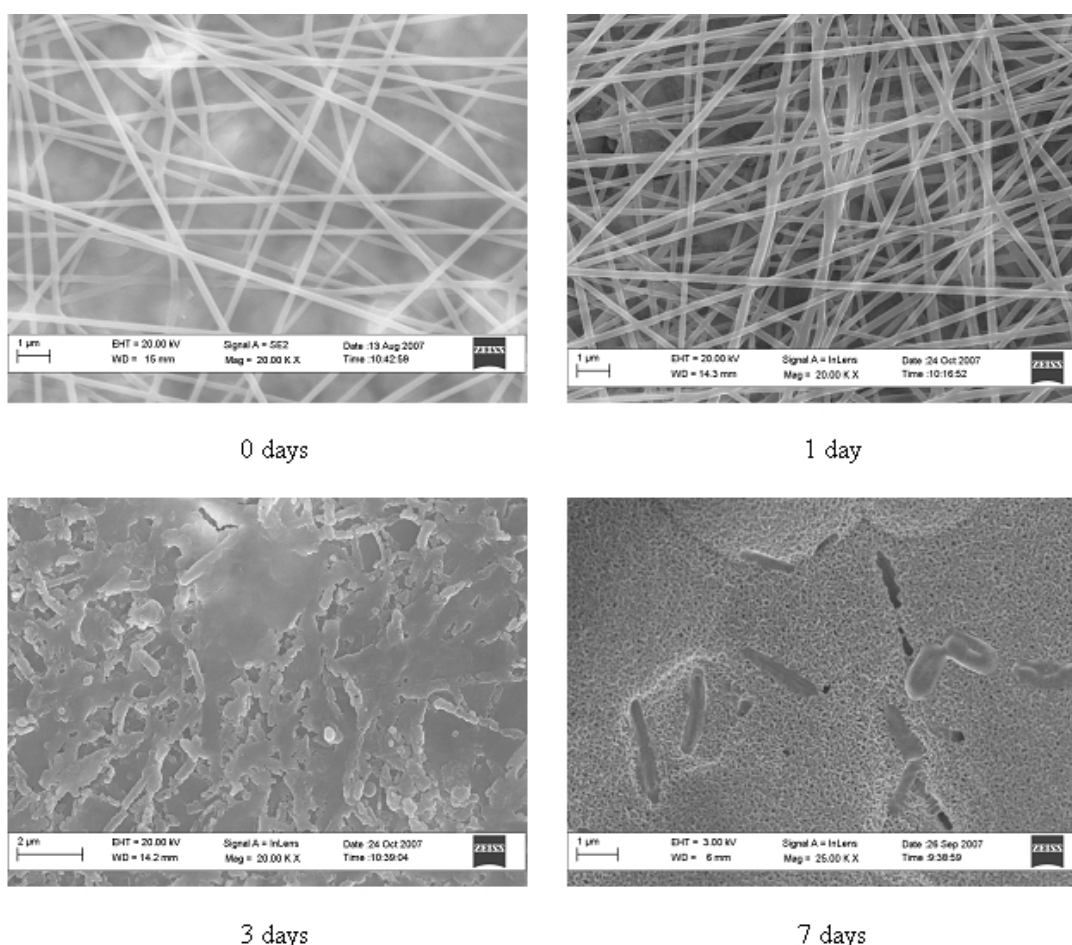
W badaniach nad otrzymaniem ceramiki pokrytej nanowłóknami wykorzystano PHB i PHBV pochodzące z syntezy bakteryjnej oraz PEO i PCL otrzymane syntetycznie. Elektroprzędzono 2% roztwory PHB lub PHBV w 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE), oraz 1,25% PCL i 1,25% PEO w chloroformie (sumaryczne stężenie polimerów 2,5%). Elektroprzędzenie przeprowadzono w standardowych warunkach i w typowym zestawie do elektroprzędzenia opisanym w tym raporcie.

W pierwszym etapie pracy przeprowadzono standardową procedurę poszukiwania warunków elektroprzędzenia umożliwiającą otrzymanie włókien o właściwej strukturze. Znaleziono warunki prowadzenia procesu i rozpuszczalników użytych dla odpowiednich polimerów użyto do produkcji próbek materiałów. Ustalono jako optymalne warunki: odległość dysza/target 15 cm, wydatek masowy pompy 0,5 ml/godzinę, napięcie 15kV. Nanowłóknami pokrywano ceramikę typu 45S5 Bioglass otrzymaną przez spiekanie cząstek o wielkości 5µm w temperaturze 1100°C przez 1 godzinę. Otrzymany materiał, którego próbkę przedstawiono na rysunku 4-12, zawierał głównie fazę krystaliczną $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$.

Uzyskane materiały poddano testom bioaktywności i mineralizacji. W ich trakcie próbki były zanurzone w roztworze wodnym symulowanego płynu fizjologicznego (SBF) przy pH 7,3 w temperaturze 37°C. W czasie zanurzenia na materiale tworzyły się kryształy hydroksyapatytu (HAP). Następnie pobrane po 1, 3, 7 i 14 dniach próbki analizowano pod mikroskopem elektronowym (SEM) i za pomocą rentgenografii strukturalnej (XRD).



Rys. 4-12 Siatka z nanowłókn PHB przykrywająca powierzchnię materiału Bioglass®. Szerokość zdjęcia odpowiada 6,9mm.



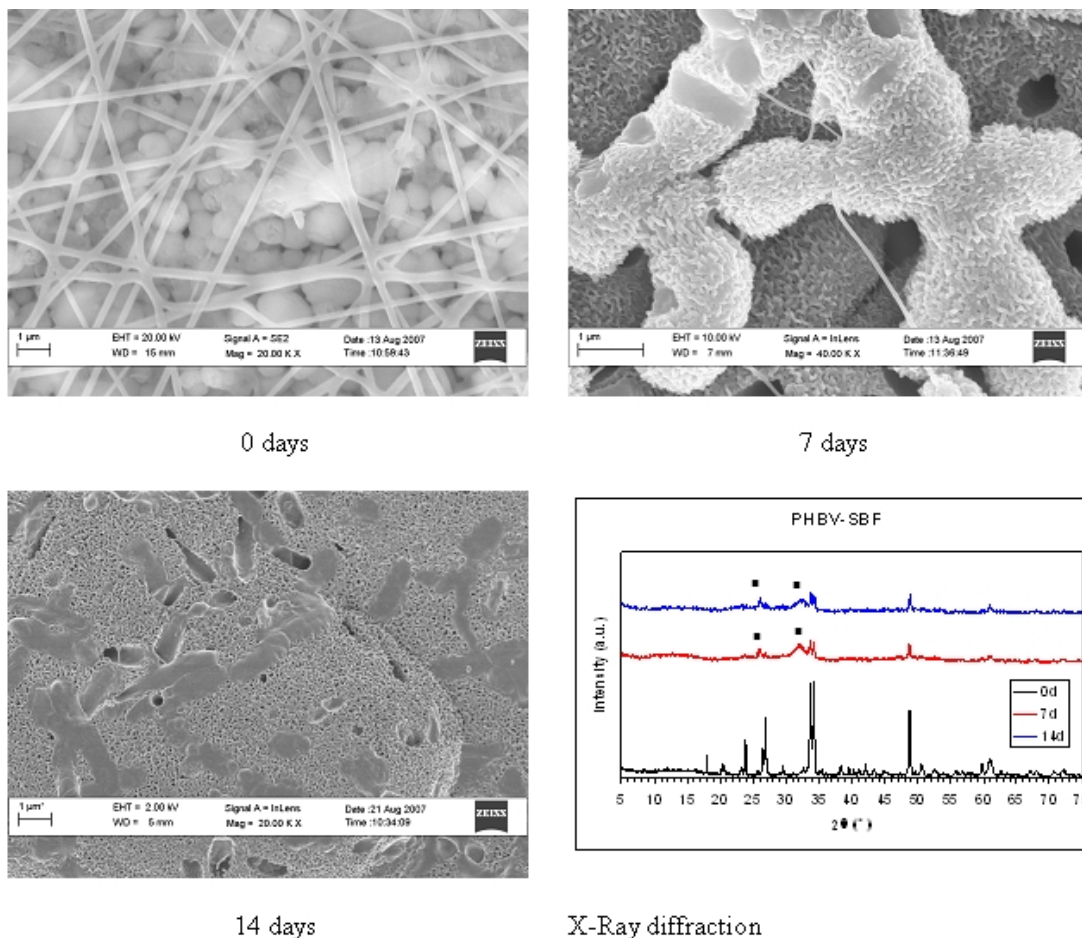
Rys. 4-13 Nanowłókna PHB pokrywające materiał Bioglass, zanurzone w SBF na określoną ilość dni.

Rysunki 4-13 i 4-14 pokazują wyniki testów mineralizacji włókien oraz obrazy włókien przed mineralizacją. Włókna testowanych na początku materiałów, PHB i PHBV, elektroprzędzone z roztworu TFE, są cieńsze (około 100nm) niż włókna PCL/PEO, w których jako rozpuszczalnika użyto chloroformu (około 600nm). Wybór użytego rozpuszczalnika miał zatem wielki wpływ na kształt otrzymanych nanowłókien.

Zachowanie próbek w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) przeprowadzono dla określenia warunków biomineralizacji włókien. Stwierdzono, że tworzona cienka warstwa hydroksyapatytu dobrze współgrała z warstwą tworzoną jednocześnie na materiale Bioglass.

Zdjęcia SEM zrobione po 7 dniach zanurzenia próbek w SBF pokazały, że powierzchnia nanowłókien z PHB była całkowicie pokryta kryształami (Rys. 4-13), a dane rentgenografii strukturalnej potwierdziły, że były to kryształy HAP obecne w próbce zarówno po 7 jak i 14 dniach. Bardzo podobnie zachowały się próbki sporządzone z PHBV (Rys. 4-14).

Również obrazy otrzymane dla biomineralizacji włókien z PCL wykazywały powstanie dwóch warstw HAP: na włóknach i na materiale Bioglass – obie były ze sobą wzajemnie związane. Dodatkowo zaobserwowano mikroporowatość materiału po wypłukaniu PEO. Ta dodatkowo uzyskana cecha może być szczególnie cenna dla zasiedlania rusztowania osteoblastami (komórkami kości) i natywizacji implantu.



Rys. 4-14 Nanowłókna PHBV pokrywające materiał Bioglass, zanurzone w SBF na określoną ilość dni. Obrazy w SEM i XRD. Na obrazie XRD kwadratami zaznaczono piki tworzącego się HAP.

Podsumowanie i wnioski

Uzyskano siatki z elektroprzędzonych nanowłókien z PHB, PHBV, i PCL/PEO, przykrywające powierzchnię ceramicznego materiału Bioglass. Określono ich bioaktywność i mineralizację w symulowanym płynie fizjologicznym. Stwierdzono, że wszystkie trzy testowane materiały wykazały wysoką bioaktywność, promowały wzrost kryształów HAP, których warstwa przylegała do kryształów tworzących się na ceramice. Znalaziono różnice w grubości i porowatości włókien, które zmieniają wygląd tworzącej się powłoki HAP. Początkowo włóknista struktura była rozpoznawalna po 14 dniach testu w SBF tylko dla

grubszych włókien z PCL/PEO (600nm). Tworzenie się kryształów na powierzchni nanowłókien daje w efekcie materiał o strukturze naśladującej ECM, co powinno ułatwić przyczepność i wzrost osteoblastów. Rezultaty badań opublikowano w załączonej do raportu pracy [21].

4.4 Optymalizacja tworzenia rusztowań z nanowłókien

Celem kolejnego zadania przy realizacji projektu było określenie zależności pomiędzy parametrami procesu elektroprzędzenia, strukturą molekularną (stopień orientacji molekularnej oraz krystaliczność), a funkcjonalnością, jako rusztowań do hodowli komórkowej *in vitro*. Nacisk pracy położono na wypracowanie metodyki oraz przeprowadzenie możliwie pełnej, ilościowej analizy zewnętrznych cech struktury, takich jak grubość czy porowatość, ale również struktury wewnętrznej nanowłókien: stopnia orientacji molekularnej oraz krystaliczności. Znajomość orientacji molekularnej oraz budowy krystaliczno-amorficznej w różnych warunkach elektroprzędzenia pozwala na ocenę efektywności i prawidłowości przebiegu procesu przędzenia.

Elektroprzędzeniu poddawany był roztwór składający się z poli(kaprolaktonu) o $M_w=80.000$ Da (Aldrich) oraz mieszaniny chloroformu i N.N-dimetyloforamidu lub chloroformu i metanolu w różnych proporcjach. Stężenie polimeru wynosiło od 7-14%. Zastosowano potencjał 5 -10kV (Tabela 4-1). Kolektor zbiorczy był oddalony o 15cm od dyszy strzykawki. Wydatek roztworu wynosiła 0,2ml/h (dla wybranych próbek 0,3ml/h).

Tabela 4-1 Zestawienie badanych roztworów.

	polimer	roztwór	stężenie	napięcie [kV]
1	PCL poli(kaprolakton)	chloroform/ metanol	7-14%	5-25
2	PCL poli(kaprolakton)	chloroform/ DMF	7-10%	5-25

Próbki przygotowywano do badań z użyciem:

- mikroskopu interferencyjno-polaryzacyjnego PolarBi PZO,
- mikroskopu optycznego Nikon,
- skaningowego mikroskopu elektronowego JSM-390LV,
- w różnicowego kalorymetru skaningowego Pyris 1,
- do hodowli komórkowych *in-vitro*.

Próbki do badań za pomocą mikroskopii przedzone były bezpośrednio na szkiełka, w kontrolowanym czasie 2 min. Do badań kalorymetrycznych wykorzystano maty przedzone na siateczkę miedzianą w czasie 30min. Komórki hodowano na okrągłych sterylizowanych szkiełkach nakrywkowych o średnicy 15mm.

Tabela 4-2. przedstawia wyniki rozmiaru włókien zmierzone w programie QCapture na podstawie zdjęć SEM. Podana wartość jest uśrednieniem z 18 pomiarów.

Tabela 4-2. Zestawienie rozmiaru włókien wybranych próbek.

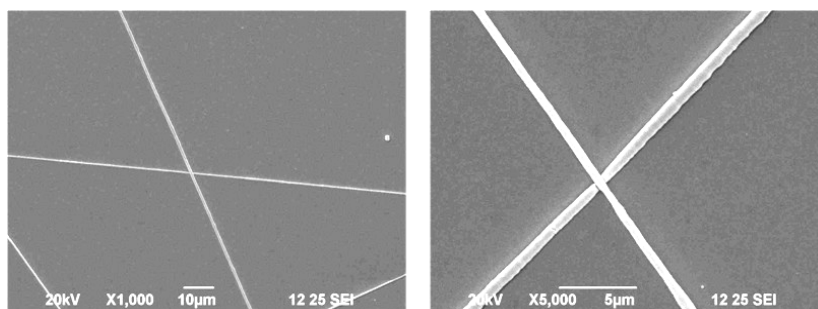
Oznaczenie próbki	Napięcie [kV]	Rozmiar [μm]	Odchylenie standardowe \pm
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	7,5	0,643	0,140
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	8,5	0,739	0,409
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	10	1,183	0,416
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	15	0,784	0,387
PCL8% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	7,5	0,388	0,157
PCL8% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	8,5	0,812	0,050
PCL8% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	10	0,561	0,139
PCL9% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	10	0,624	0,216
PCL9% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	12,5	0,989	0,580
PCL9% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25	15	0,610	0,261
PCL7%, CHCl ₃ /DMF 50/50	10	0,410	0,268
PCL7%, CHCl ₃ /DMF 50/50	15	0,422	0,178
PCL7%, CHCl ₃ /DMF 50/50	20	0,196	0,052
PCL10%, CHCl ₃ /DMF 50/50	7,5	0,346	0,023
PCL10%, CHCl ₃ /DMF 50/50	10	0,353	0,133
PCL10%, CHCl ₃ /DMF 50/50	15	0,250	0,021
PCL0-7%, CHCl ₃ /DMF 50/50	7,5	0,568	0,669
PCL0-7%, CHCl ₃ /DMF 50/50	10	0,156	0,029
PCL14% CHCl ₃ /DMF 75/25	7,5	0,621	0,135
PCL14% CHCl ₃ /DMF 75/25	8,5	0,449	0,038

Średni rozmiar włókien jest bardzo zróżnicowana, w zależności od stężenia polimeru, rozpuszczalników oraz przyłożonego napięcia; mieści się w zakresie od 156nm do 1,183 μm . Zróżnicowanie w obrębie próbki można zauważyć na długości włókna, jak również włókien względem siebie.

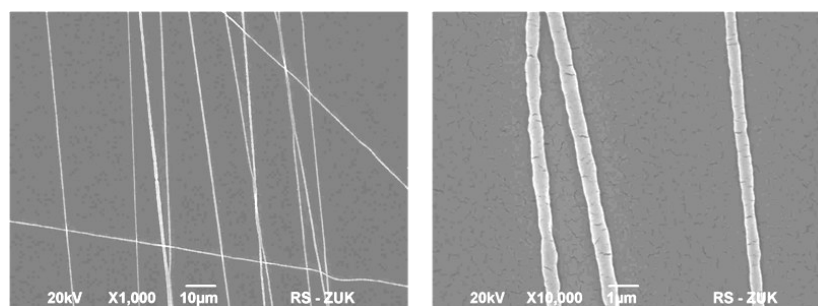
Różnice budowy włókien można określić na zdjęciach z SEM (Rys. 4-15).

Włókna przędzone z roztworu CHCl₃/DMF wykazują większą zdolność do tworzenia wydłużonych kropeł na długości włókna, jednak są znacznie cieńsze od włókien przędzonych z roztworu CHCl₃/CH₃OH.

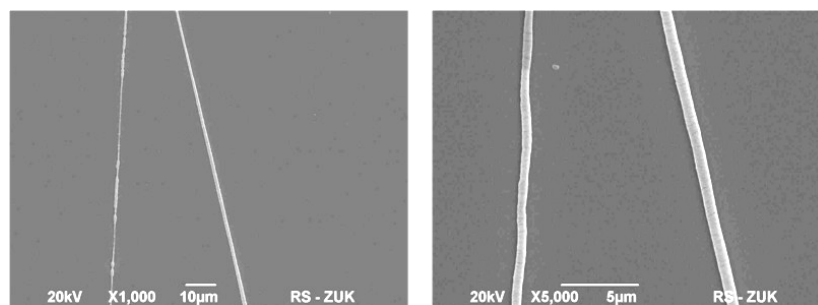
Wykresy 4-16 i 4-17 obrazują zależność rozmiaru włókien od stężenia polimeru i przyłożonego napięcia.



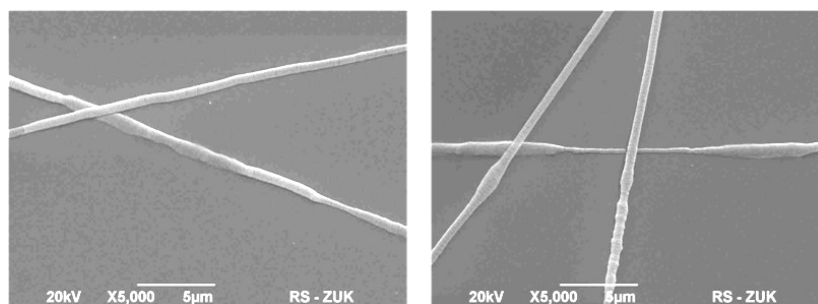
PCL7% CHCl₃/CH₃OH 75/25 7,5kV



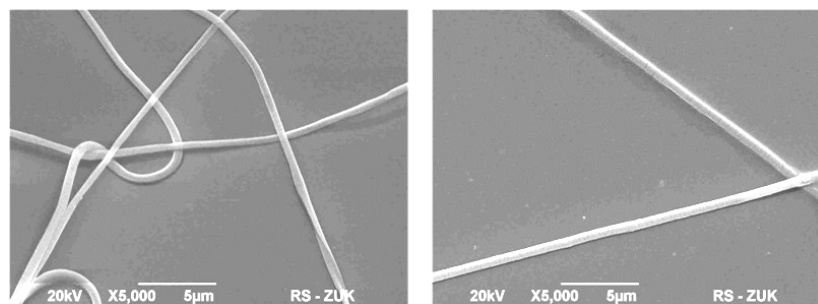
PCL8% CHCl₃/CH₃OH 75/25 7,5kV



PCL9% CHCl₃/CH₃OH 75/25 7,5kV

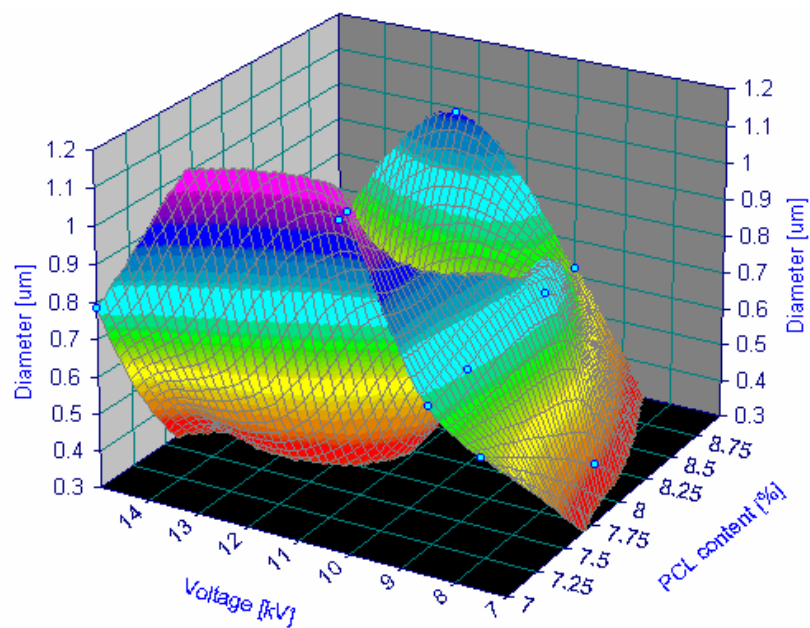


PCL14%, CHCl₃/DMF 75/25 7,5kV, 0,3ml/h

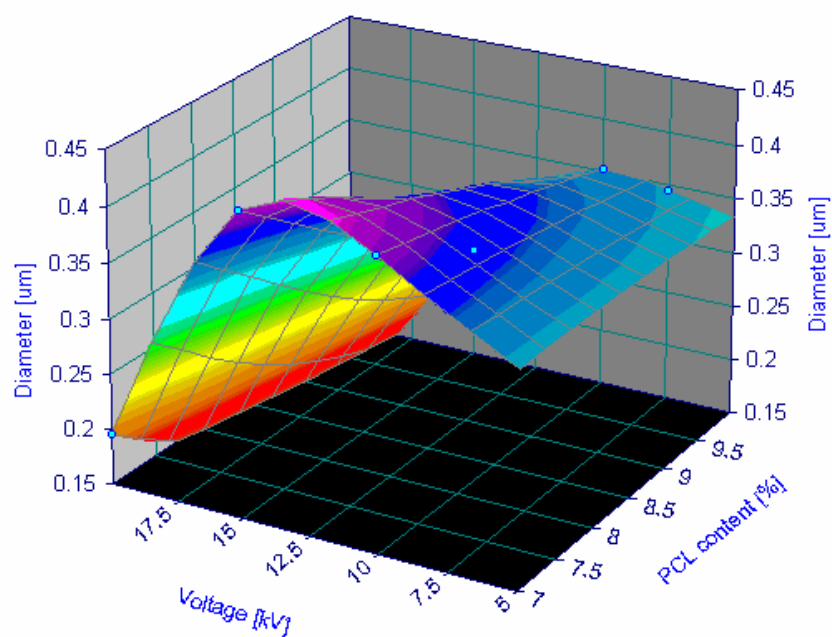


PCL14%, CHCl₃/DMF 75/25 8,5kV 0,2ml/h

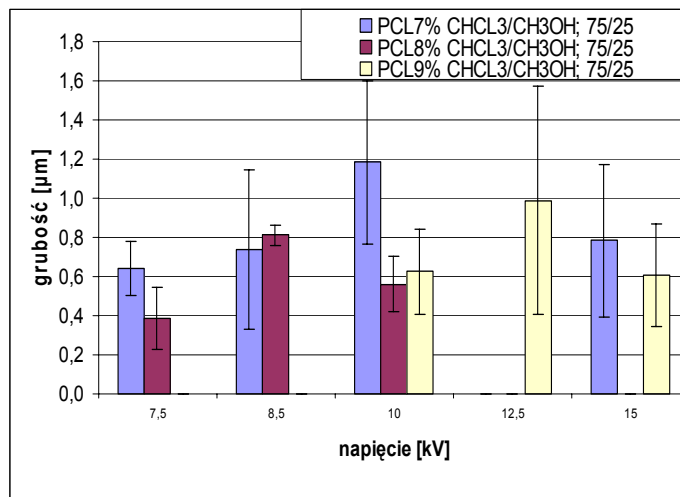
Rys. 4-15 Zdjęcia SEM poli(kaprolaktonu) w różnych rozpuszczalnikach przy powiększeniu 1000 i 5000x.



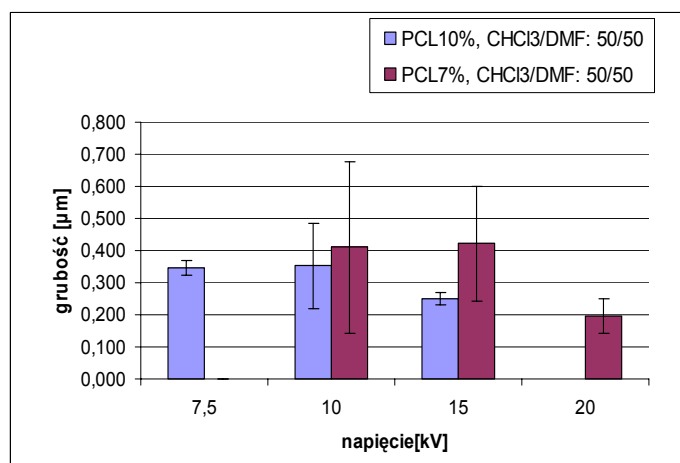
Rys. 4-16 Zależność rozmiaru włókien od stężenia PCL i przyłożonego napięcia dla próbek przedzonych z roztworu $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 75:25.



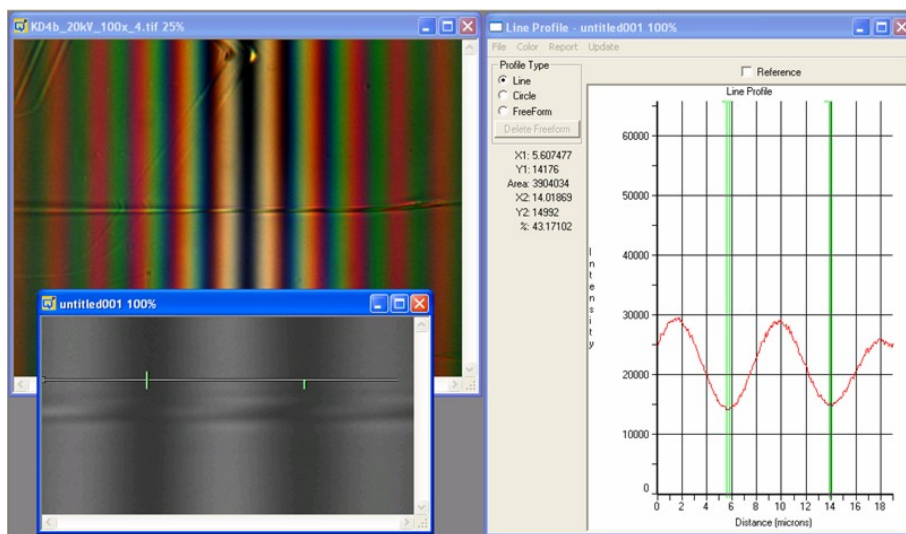
Rys. 4-17 Zależność grubości od stężenia PCL i przyłożonego napięcia dla próbek przedzonych z roztworu CHCl_3/DMF 50:50.



Rys. 4-18 Zależność średniego rozmiaru włókien PCL z roztworu $CHCl_3/CH_3OH$ przy stężeniach 7-9%.



Rys. 4-19 Zależność średniego rozmiaru włókien PCL z roztworu $CHCl_3/DMF$ przy stężeniach 7-10%.



Rys. 4-20 Procedura pomiaru dwójłomności na przykładzie włókna PCL 7%, $CHCl_3/DMF$: 50/50.

Rysunek 4-20 pokazuje przykładowy obraz z mikroskopu interferencyjno polaryzacyjnego w polu prążkowym oraz procedurę pomiaru dwójłomności.

Z wykorzystaniem mikroskopu interferencyjno-polaryzacyjnego zmierzono średnie dwójłomności wytworzonych włókien (Tabela 4-3).

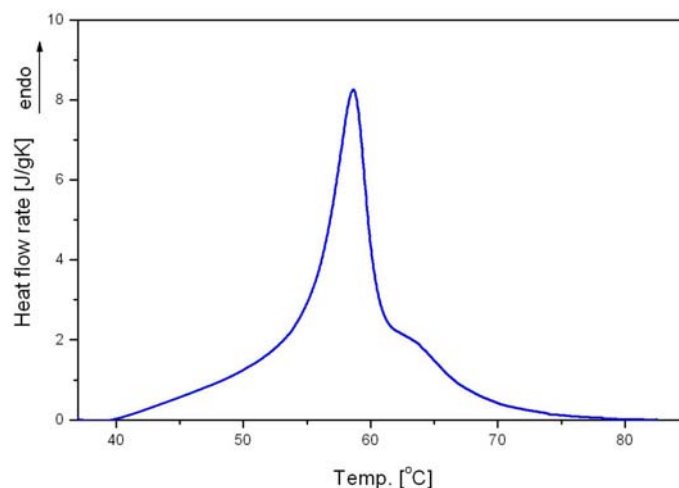
Tabela 4-3 Zestawienie dwójłomności włókien otrzymanych metoda elektroprzędzenia.

Włókna	Δn
PCL7%, CHCl ₃ /DMF 50/50_10kV	0,046
PCL7%, CHCl ₃ /DMF 50/50_20kV	0,024
PCL10%, CHCl ₃ /DMF 50/50_15kV	0,124
PCL10%, CHCl ₃ /DMF 50/50_7,5kV	0,069
PCL8% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_7,5kV	0,079
PCL0-7%, CHCl ₃ /DMF 50/50_7,5kV	0,055
PCL9% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_10kV	0,072
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_15kV	0,074
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_12,5kV	0,072
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_10kV	0,071
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_8,5kV	0,057
PCL8% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_8,5kV	0,084
PCL14% CHCl ₃ /DMF 75/25_8,5kV	0,062

Przy pomocy DSC określano temperaturę topnienia przedzonych próbek (Tabela 4-4).

Tabela 4-4 Wyniki badań temperatury topnienia włókien.

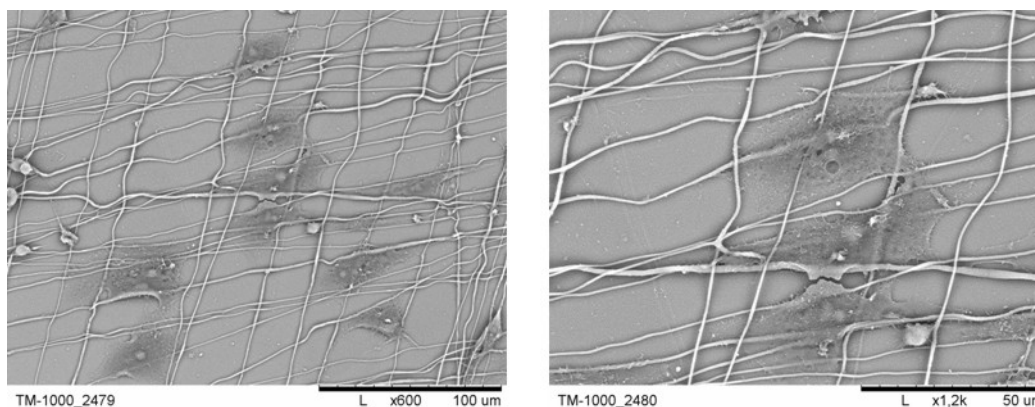
PCL7% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_7,5kV	58,8
PCL8% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_7,5kV	58,8
PCL9% CHCl ₃ /CH ₃ OH 75/25_7,5kV	61,1
PCL14% CHCl ₃ /DMF 75/25_5kV	58,3
PCL14% CHCl ₃ /DMF 75/25_7,5kV	58,0
PCL14% CHCl ₃ /DMF 75/25_12kV	58,2
PCL14% CHCl ₃ /DMF 75/25_15kV	58,2



Rys. 4-21 Przepływ ciepła w funkcji temperatury dla próbki 14% PCL CHCl₃/DMF 75/25.

Rysunek 4-21 obrazuje przebieg topnienia dla próbki 14%PCL CHCl₃/DMF 75/25.

Na wybranej grupie włókien przeprowadzono hodowle hepatocytów (komórek wątroby) (Rys. 4-22).



Rys. 4-22 Hodowla hepatocytów na podłożu PCL14% CHCl₃/DMF 75/25

4.5 Próba hodowli komórek na rusztowaniach z nanowłóknien

Przebadano dwa rodzaje rusztowań z nanowłóknien – wykonane z poli(hydroksymaślanu), PHB oraz z poli(kaprolaktonu), PCL i poli(tlenku etylenu), PEO. Na każdym z podłoży założono hodowlę astrocytów – dużych, o licznych wypustkach i posiadających zdolność do fagocytozy komórek pełniących między innymi funkcje odżywcze i ochronne w stosunku do neuronów. Badania hodowli nie zakończyły się powodzeniem.

Powadzenie hodowli komórkowych wymaga sterylnych warunków i specyficznego sprzętu. Dlatego też takie pomieszczenia powinny posiadać przestrzeń pracy jałowej, którą zapewniają komory laminarne ze sterylnym przepływem powietrza. Komórki są bardzo podatne na zmiany środowiska zewnętrznego stąd w celu zapewnienia stabilnych warunków komórkom, hodowlę prowadzi się w inkubatorach z CO₂. Pozwalają one na kontrolę i stabilizację stężenia CO₂, temperatury i wilgotności powietrza. Aby nie zakłócić delikatnej równowagi komórek, woda wchodząca w skład pożywek czy też buforów wykorzystywanych w hodowlach komórkowych musi odznaczać się szczególnie wysokim stopniem czystości

(oporność 18 mΩ, TOC (całkowity węgiel organiczny) < 10ppb, brak cząstek > 0,22 μm). W związku z powyższym wszelkie eksperymenty przeprowadzono w przystosowanych do hodowli komórkowych pomieszczeniach Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN.

Większość hodowanych komórek dla prawidłowego rozwoju wymaga przyczepienia się (zakotwiczenia) do podłoża. Obecnie hodowle prowadzi się w plastikowych, głównie polistyrenowych, naczyniach (szalkach Petriego lub w specjalnych butelkach do hodowli komórkowych). Polistyren jest hydrofobowy, co uniemożliwia adhezję komórek do podłoża. W związku z tym musi być on poddawany dalszej obróbce. Zwykle polistyren jest albo naświetlany promieniami gamma albo poddawany działaniu różnych związków chemicznych czy też pokrywa się go białkami wchodzącymi w skład macierzy zewnątrzkomórkowej np. kolagenem, fibronektyną czy laminą. Dodatkowo hodowle prowadzone w tego typu naczyniach są zwykle dwuwymiarowe. Takie komórki wykazują zmiany w przebiegu wzrostu komórki, w metabolizm czy ekspresji genów w stosunku do tego samego typu komórek *in vivo*. Wynika to z faktu, że w organizmie komórki przyczepione są do licznych powierzchni i wspomagane przez inne komórki, struktury czy też białka. Tak, więc normalnym otoczeniem komórki jest złożona sieć małych włókien, przerw i porów wypełnionych płynem zawierającym tlen, hormony, rozpuszczone białka oraz składniki odżywcze. Całość tworzy bardzo skomplikowane trójwymiarowe środowisko. Wytworzenie trójwymiarowego podłoża o specyficznych właściwościach było głównym celem naszych badań. Pierwszym etapem badań było dobranie takiego składu nanowłókien by tworzyły ono podłoże nietoksyczne, adhezyjne i w pewnych układach diagnostyczne. W tym celu szklane szalki Petriego zostały pokryte, metodą elektroprzędzenia, nietoksycznymi nanowłóknami z poli(3-hydroksymaślanu) (PHB) zawierającymi barwnik fluorescencyjny Rodaminę B. Włókna poli(3-hydroksymaślanu) odpowiadają wielkością włóknom białkowej macierzy zewnątrzkomórkowej i powinny zwiększyć adhezyjność powierzchni szalki. Natomiast Rodamina B jest barwnikiem fluorescencyjnym o słabym fotowysyblaniu, łatwym w detekcji (maksimum emisji przy 610nm) i zdolnym do wnikania do wnętrza komórek (1). Przy pomocy rodaminy B chciano wykazać, że nanowłókna są doskonałym nośnikiem sond fluorescencyjnych (diagnostyka stanu komórki) i potencjalnym nośnikiem substancji odżywczych. Drugim typem przebadanych podłoży były różnej gęstości podłoża z nietoksycznych nanowłókien składających się z mieszanki polimerów PCL (poli(kaprolaktonu)) i PEO (poli(tlenku etylenu)) w stosunku 50% do 50% oraz 2% Rodaminy B. Kontrolą eksperymentu była czysta szalka Petriego.

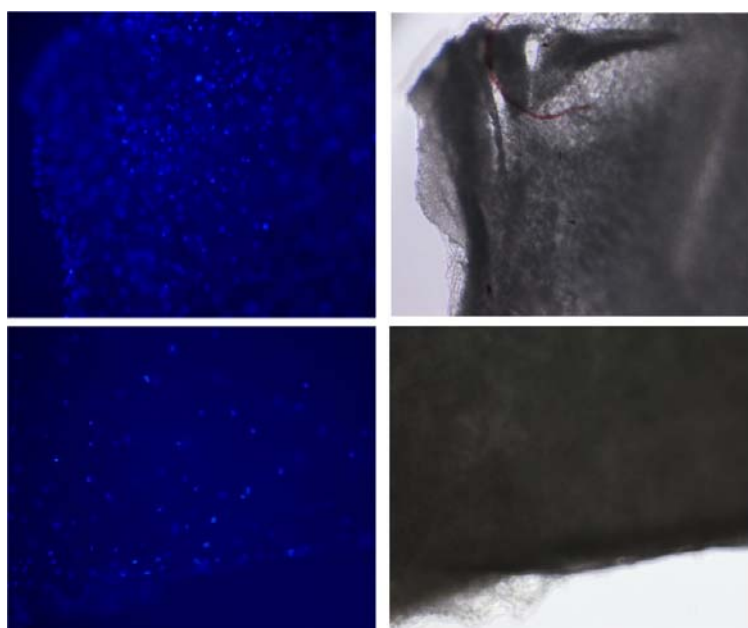
Astrocyty do hodowli pozyskano z dwudniowych osesków szczurzych. Zawiesinę komórek otrzymaną z wypreparowanego mózgu osesków wysiano w pożywkę hodowlaną zawierającą 10-20 % surowicy. Po 3 dniach hodowlę podano wytrząsaniu w temperaturze 37°C przez około 12 godzin, co pozwoliło na usunięcie z hodowli komórek nerwowych i mikrogleju. Następnie po wymianie pożywki hodowlę prowadzono przez kolejne 3 dni. Po tym czasie astrocyty przeniesiono do wcześniej przygotowanych szalek Petriego z podłożem z nanowłókien. Badane podłoża uległy oderwaniu od powierzchni szalek pod wpływem pożywki hodowlanej. Oderwanie spowodowało śmierć astrocytów pozbawionych zakotwiczenia do powierzchni [73].

4.6 Hodowla ludzkich komórek na rusztowaniach z elektroprzędzonego PLLA

Celem kolejnych prac badawczych było otrzymanie komórek ludzkich na rusztowaniu z nanowłókien z elektroprzędzonego poli(L-laktydy), PLLA. We wszystkich eksperymentach udało się wyhodować żywe komórki.

Rusztowania tkankowe z elektroprzędzonego PLLA o wymiarach 1cmx1cm przygotowywano według [48]: 4,00 g poli(L-laktydu), (PLLA, Biomer® L900, Mw=200kDa; Biomer) rozpuszczono w 25 ml (37,25g) chloroformu i 2,5 ml (2,375g) dimetyloformamidu (DMF). Tak uzyskany roztwór elektroprzędzono w standardowych warunkach, odległość igła-kolektor – 20 cm, napięcie 16kV, wydatek roztworu – 500ul/h. Jako target zastosowano folię Al z przykrytą folią z poliwęglanu. W folii wycięto okienko 1cmx1cm. Zadaniem folii z poliwęglanu było ogniskowanie włókien na folii aluminiowej. Włókna zbierano przez 2 minuty, a następnie wycinano skalpelem z folii. Rusztowania były sterylizowane tlenkiem etylenu, a następnie umieszczone w studzienkach 24-studzienkowej płytce zawierającej medium do proliferacji komórek zawierającym układ penicylina/streptomycyna (Invitrogen, Nr. Kat. 15140122). Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (ze szpiku kostnego) zawieszono w medium gęstość 2×10^6 komórek/ml. 100 μ l zawiesiny komórek macierzystych zakropiono na powierzchnię każdego rusztowania z PLLA i inkubowano w atmosferze 5%CO₂ i temperaturze 37C.

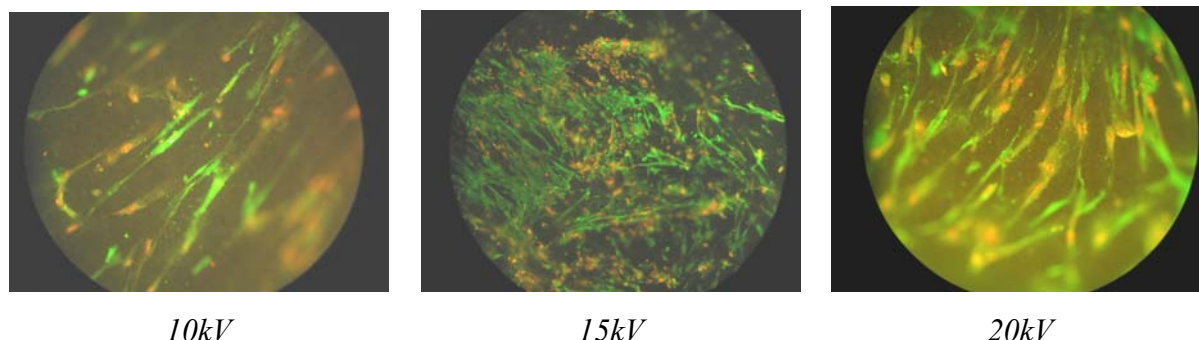
Po dwóch tygodniach komórki wybarwiono fluorescencyjnym barwnikiem Hoechst 33258 (wybarwia DNA żywych komórek), a następnie obserwowano w mikroskopii optycznej i fluorescencyjnej. Stwierdzono, że rusztowanie z PLLA zostało zasiedlone komórkami. Żywe komórki mezenchymalne zasiedlają rusztowanie (Rys. 4-23, martwe pływałyby w pożywce), wybarwienie potwierdziło obecność żywych komórek na powierzchni rusztowania.



Rys. 4-23 Siatka z nanowłókien PLLA zasiedlonych przez ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste. Obraz z mikroskopii optycznej i fluorescencyjnej. W obrazie fluorescencyjnym widoczne są wybarwione barwnikiem Hoechst 33258 żywe komórki zasiedlające rusztowanie.

4.7 Hodowla ludzkich komórek na optymalizowanych rusztowaniach z nanowłókien

Kontynuacja prac badawczych nad otrzymaniem komórek ludzkich na rusztowaniu z nanowłókien z elektroprzędzonego poli(L-laktydy), PLLA, polegała na próbie optymalizacji procesu z doбором napięcia użytego do elektroprzędzenia. Różnice cech otrzymanych mat przy różnych napięciach objawiały się różną liczbą wyhodowanych komórek zasiedlających rusztowania.



10kV

15kV

20kV

Rys. 4-24 Komórki ludzkie zrębu pępowiny (UCSC – macierzyste) wyhodowane na rusztowaniu z elektroprzędzonego PLLA przy napięciach 10, 15 i 20 kV. Wybarwienie oranżem akrydyny. Barwa zielona – komórki żywe, barwa pomarańczowa – martwe.

Rusztowania wykonano z PLLA na podstawie prac [64, 48]. W celu wykonania włókien 2g poli(L-laktydu) rozpuszczono w mieszaninie 12.5 cm³ (18,7g) chloroformu CHCl₃ i 2,5 cm³ (2,4 g) N,N-dimetyloformamidu (DMF). Rusztowania przedzono w standardowych warunkach przy wydatku 0,8 ml/h, dla odległości dysza-target 15cm. Utworzono 3 rusztowania – przy potencjałach 10, 15 i 20 kV, różniły się regularnością włókien, najlepsze były dla 15 kV. Sporządzono 3 siatki z PLLA dla czasów tworzenia odpowiednio 3, 10 i 5 minut. Mata dla 15 minut była najrówniej pokryta, dla 20 kV była zbyt skupiona, miała wyraźnie nierówną grubość, dla 10kV była nieskupiona i za cienka.

Próbki wybarwiane były z użyciem oranżu akrydyny. Komórki zabarwione na zielono są żywe, komórki z pomarańczowym jądrem komórkowym są martwe. Użyte komórki: UCSC (umbilical cord stroma cells, komórki zrębu pępowiny), rodzaj komórek macierzystych (progenitorowych). Mają ekspresję wielu wczesnych białek. Dają się różnicować w różne linie komórek pochodzenia mezenchymalnego. Jednak niektórzy badacze uważają, że są to po prostu miofibroblasty.

Komórki dobrze rosły na membranie uzyskanej dla 15 kV, słabiej dla 20 kV, prawie nie rosły na 10kV.

Na przedstawionych wyżej fotografiach widoczne są kolonie ludzkich komórek zasiedlających rusztowania z nanowłókien. Najlepsze wyniki uzyskano dla maty wyprodukowanej przy napięciu 15kV.

4.8 Elektroprzędzenie komórek

Po udanych eksperymentach z hodowlą komórek podjęto dalsze badania, które można określić jako elektroprzędzenie komórek. Pod tą nazwą rozumiane jest proces tworzenia maty z nanowłókien, gdzie materiałem do ich produkcji była emulsja zawierająca żywe komórki. Proces tworzenia mat ogólnie polegał na już wcześniej opisanej technologii.

Elektroprzędzenie emulsji z żywymi komórkami jest pierwszą tego typu próbą, wcześniej niestosowaną przez inne ośrodki badawcze. Przeprowadzone badania składały się z następujących etapów:

- uzyskanie stabilnej odwróconej emulsji, zamknięcie mikrokapsulek w odwróconej emulsji oraz jej elektroprzędzenie;
- zamykanie komórek drożdży w emulsji, jako model badań komórkowych, testy żywotności z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych, elektroprzędzenie otrzymanej emulsji, testy żywotności drożdży w mikrokapsułkach;
- otrzymanie emulsji zawierającej erytrocyty, znalezienie właściwego antykoagulanta i jego stężenie w fazie wodnej, testy integralności na podstawie obserwacji mikroskopowych;
- zamknięcie cząstek fluorescencyjnych wewnątrz mikrokapsulek i elektroprzędzenie;
- zamykanie komórek ludzkich w emulsji, elektroprzędzenie emulsji i testy żywotności komórek.

Celem pracy było zbadanie możliwości tworzenia “pseudo-tkanek” – żywych komórek ludzkich zorganizowanych wewnątrz biodegradowalnego rusztowania tkankowego. Dotychczas stosowaną metodę współosiową¹ zastąpiono nową metodą, w której wodny roztwór komórek tworzy fazę rozproszoną emulsji, zaś roztwór biodegradowalnego polimeru w rozpuszczalniku organicznym tworzy fazę ciągłą. Układ taki nosi nazwę “odwróconej emulsji” (typowa emulsja zawiera krople oleju zawieszzone w fazie wodnej).

4.8.1 Optymalizacja sposobu otrzymywania emulsji

Elektroprzędzenie odwróconej emulsji umożliwia uzyskanie mikrokapsulek fazy wodnej połączonych nanowłóknami, które tworzą zorganizowaną strukturę. Wewnątrz kapsulek umieszczono drożdże piekarnicze (*Sacharomyces cerevisiae*, budding yeast), jako model jednokomórkowego organizmu eukariotycznego, jako modelową komórkę ludzką zastosowano czerwone krwinki – erytrocyty.

Celem badań było utworzenie odwróconej emulsji (woda w oleju), która byłaby jednocześnie stabilna (odporność na koalescencję) jak również nie wykazywała szybkiej separacji faz (wypływanie na powierzchnię mikropęcherzyków fazy wodnej spowodowane różnicą gęstości) w stopniu wystarczającym do elektroprzędzenia otrzymanej emulsji. Metodę otrzymywania odwróconej emulsji zaczerpnięto z pracy Qi [85]. Zaproponowano dwie różne metodologie:

1. Zastosowanie homogenizatora/emulsyfikatora łopatkowego. Użyto 150 mg (0.52mmol) dodecylosiarczanu sodowego (SDS, POCh), jako surfaktanta, którego dodatek zmniejsza napięcie powierzchniowe zawieszono w 25 ml (33 g) CH_2Cl_2 ; dodano 3g 2% wodnego roztworu alginianu sodowego (Fluka). Mieszaninę homogenizowano z prędkością 8.000 obr./min przez 10 min. Nie otrzymano emulsji. W następnej próbie wzięto nową porcję 25 ml (33g) CH_2Cl_2 , 3.0 g 2% wodnego roztworu alginianu sodowego i 200 mg SDS

¹ Metoda współosiowa (coaxial electrospinning): elektroprzędzenie w układzie „rura w rurze”: roztwór polimeru tworzącego otoczkę włókna jest podawany kapilarą zewnętrzną, podczas, gdy roztwór tworzący rdzeń włókna jest podawany kapilarą wewnętrzną.

(0.69mmol) i homogenizowano 3 razy po 10 min z prędkością 10.000 obr/min. Pomimo znacznie dłuższego czasu homogenizacji nadal nie otrzymano odwróconej emulsji, zauważono raczej tworzenie emulsji oleju w wodzie.

2. Kolejne emulsje sporządzano z zastosowaniem homogenizacji ultradźwiękami. We wszystkich dalszych eksperymentach jako fazę ciągłą (organiczną) zastosowano roztwór zawierający 250mg (0.22mmol) seskwioleinianu sorbitanu (sesquioleate sorbitan, Aldrich) jako surfaktanta, 515mg kopolimeru akrylanu z akrylanem etanoloaminy (Eudragit RSPO, Rohm) jako stabilizatora emulsji i 1250mg poli(kwasu L-mlekowego) (PLLA, Biomer L900, Mw=200kDa; Biomer), którego funkcją było utworzenia biodegradowalnego rusztowania komórkowego, rozpuszczone w 19 ml (25g) chlorku metylenu CH_2Cl_2

Faza rozproszona (wodna) w dalszych eksperymentach utworzona była z 1% wodnego roztworu alginianu sodowego. Obie fazy wymieszano w proporcji wagowej: 5:1 (faza organiczna: faza wodna) i homogenizowano z zastosowaniem łaźni ultradźwiękowej przez 10-15 min.

Uzyskano emulsję zanikającą stopniowo wskutek koalescencji. Pomimo to uzyskaną emulsję wykorzystano do elektroprzędzenia, jednakże wskutek dużej różnicy gęstości faz organicznej (chlerek metylenu o gęstości $1,33 \text{ g/cm}^3$) i wodnej (około 1 g/cm^3) emulsja ulegała separacji podczas procesu, co prowadziło do częstego zatykania dyszy. Problemowi temu spróbowano przeciwdziałać dodając do fazy organicznej rozpuszczalnika o mniejszej gęstości. Zastosowanie 50%:50% wag. mieszaniny octanu etylu (o gęstości $0,897 \text{ g/cm}^3$) z chlorkiem metylenu powinno zbliżyć gęstość fazy organicznej do fazy wodnej. W układzie takim nie doszło do całkowitego rozpuszczenia składników fazy organicznej, nawet podczas mieszania przez 2 dni. Dla sprawdzenia, czy kolejność dodawania składników nie odgrywa roli w procesie przeprowadzono eksperyment, w którym składniki najpierw rozpuszczono w chlorku metylenu, a następnie stopniowo dodawano octan etylu. Podczas dodawania drugiego rozpuszczalnika PLLA stopniowo wytrącał się z roztworu. W kolejnej próbie zastosowano mniejszy, 15% dodatek octanu etylu. Taka zawartość nie powodowała jeszcze wytrącania polimeru i dalsze doświadczenia wykonywano z zastosowaniem mieszaniny rozpuszczalników chlerek metylenu: octan etylu w proporcji 85%:15% wagowo.

Sugerując się pracą Qi podjęto próbę zamykania powierzchniowego mikrokapsulek przez powierzchniowe usieciowanie jonami Ca^{2+} z zastosowaniem 5% roztworu chlorku wapnia (proporcja wagowa alginianu sodu do CaCl_2 3:1). Stwierdzono, że powierzchniowe usieciowanie mikropecherzyków wysoce destabilizuje emulsję i wywołuje szybkie utworzenie górnej fazy przez mikrokapsułki. W dalszych pracach zrezygnowano z tej koncepcji.

Rezultatem tej części badań była optymalizacja składu faz organicznej i wodnej oraz metody otrzymywania odwróconej emulsji oraz jej elektroprzędzenie.

4.8.2 Elektroprzędzenie komórek drożdży

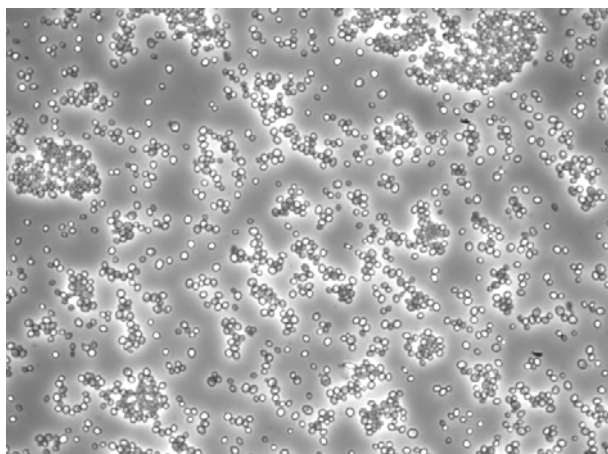
Badania nad możliwością elektroprzędzenia drożdży wymagały w szczególności:

- określenia warunków tworzenia emulsji z komórkami,
- optymalizacji wybarwiania fluorescencyjnego, umożliwiającego rozróżnienia żywych i martwych komórek i ostatecznie
- przeprowadzenia testów z elektroprzędzeniem.

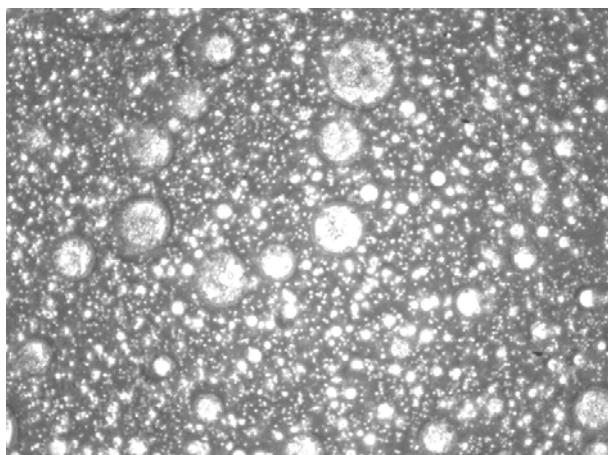
Warunki tworzenia emulsji z komórkami drożdży

Pierwszym etapem etapem elektroprzędzenia drożdży było znalezienie warunków tworzenia emulsji i jej elektroprzędzenia, które umożliwiłyby uzyskanie zawierających komórki drożdży mikrokapsulek zawieszonych na biodegradowalnych nanomikrowłóknach.

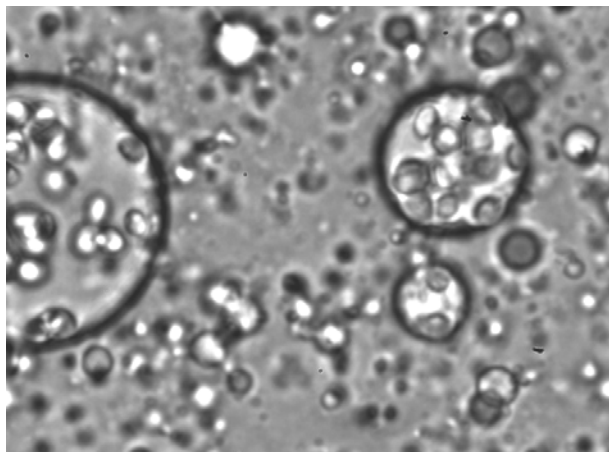
Pierwszym etapem badań było znalezienia optymalnych warunków tworzenia odwróconej emulsji zawierającej komórki drożdży. W typowym eksperymencie z 200 mg 1% roztworu alginianu sodowego i 40mg drożdży piekarniczych uzyskiwano zawiesinę (Rys. 4-25), którą po dodaniu fazy organicznej emulsyfikowano z zastosowaniem łaźni ultradźwiękowej. Zbadano, jaki jest wystarczająco krótki czas mieszania dla utworzenia dobrej jakościowo emulsji. Stwierdzono, że nawet w czasie do 5 min. komórki drożdży pozostawały integralne. Mikroskopowe obserwacje emulsji utworzonych w różnym czasie pozwoliły stwierdzić, że czas 2 minut jest wystarczający do utworzenia odpowiedniej jakościowo emulsji. Otrzymano emulsję zawierającą różne ilości komórek drożdży wewnątrz pęcherzyków fazy wodnej (Rys. 4-26 i 4-27). Na zdjęciach można wyróżnić poszczególne komórki drożdży, których różne ilości zajmują pęcherzyki fazy wodnej, w zależności od wielkości tych pęcherzyków. Dalsze eksperymenty prowadzono z zastosowaniem 2 minutowego czasu mieszania ultradźwiękowego.



Rys. 4-25 Komórki drożdży zawieszone w 1% wodnym roztworze alginianu sodowego. Widoczne komórki drożdży. Powiększenie 20x. Zastosowano kontrast fazowy.

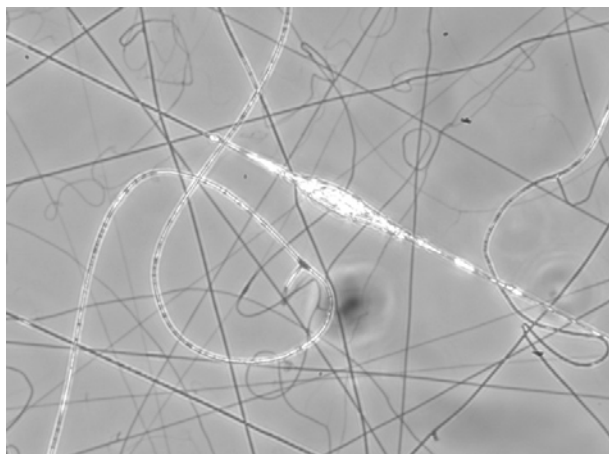


Rys. 4-26 Komórki drożdży zamknięte w mikropęcherzykach fazy wodnej w odwróconej emulsji po 2 minutach mieszania ultradźwiękowego. Wyróżnić można poszczególne komórki drożdży zamknięte w mikropęcherzykach. Powiększenie 20x. Zastosowano kontrast fazowy.

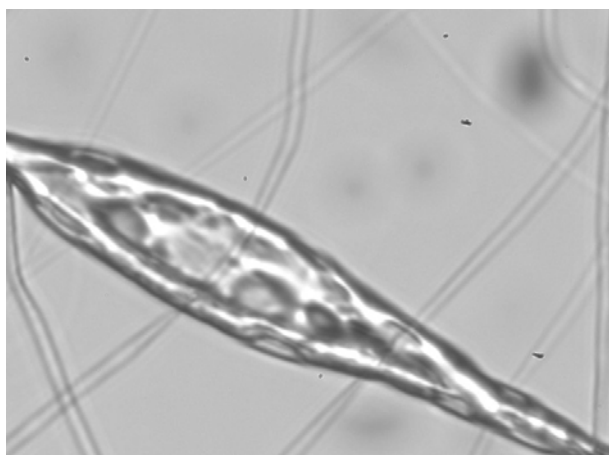


Rys. 4-27 Powiększenie mikropęcherzyków. Komórki drożdży zamknięte w mikropęcherzykach fazy wodnej w odwróconej emulsji po 2 minutach mieszania ultradźwiękowego. Widoczne różne ilości komórek drożdży zamkniętych w mikropęcherzykach. Powiększenie 100x.

Uzyskaną emulsję poddano procesowi elektroprzędzenia w warunkach zoptymalizowanych dla roztworów polimerów w rozpuszczalnikach niewodnych: odległość dysza-target 15cm, wydatek roztworu około 0.2 ml/h, napięcie 10-30 kV. Przy napięciu 15kV uzyskano nano-mikrowłókna z wbudowanymi mikrokapsułkami. Wrzecionowaty kształt mikrokapsulek świadczy o tym, że były one wyciągane podczas tworzenia włókien. Tak jak emulsja, z której zostały utworzone mikrokapsułki zamykały wewnątrz różną ilość komórek drożdży (Rys. 4-28 i 4-29).



Rys. 4-28 Przykład komórek drożdży zamkniętych w mikrokapsulce. Materiał otrzymany przez elektroprzędzenie odwróconej emulsji po 2 minutach mieszania ultradźwiękowego. Warunki elektroprzędzenia odległość dysza-target 15cm, wydatek roztworu około 0.2 ml/h, napięcie 15kV, napięcie 15 kV. Widoczne poszczególne komórki drożdży w rozciągniętej, wrzecionowatej mikrokapsulce. Powiększenie 20x. Zastosowano kontrast fazowy.



Rys. 4-29 Powiększenie mikrokapsulki zawierającej komórki drożdży. Materiał otrzymany przez elektroprzędzenie odwróconej emulsji po 2 minutach mieszania ultradźwiękowego. Warunki elektroprzędzenia odległość dysza-target 15cm, wydatek roztworu około 0.2 ml/h, napięcie 15kV, napięcie 15 kV. Widoczne poszczególne komórki drożdży w rozciągniętej, wrzecionowatej mikrokapsulce. Powiększenie 100x.

Wynikiem tej części badań było utworzenie zawierających komórki drożdży mikrokapsulek zawieszonych na biodegradowalnych nanomikrowłóknach.

Optimalizacja wybarwiania fluorescencyjnego komórek drożdży

Celem badań było zastosowanie techniki wybarwiania fluorescencyjnego komórek drożdży uwięzionych wewnątrz mikrokapsulek do stwierdzenia ich aktywności życiowej/enzymatycznej z zastosowaniem diocjanu fluoresceiny (FDA). Testy wykonywano najpierw dla zawiesiny drożdży w fazie wodnej, później badano przeżywalność komórek drożdży potraktowanych ultradźwiękami, następnie dla odwróconej emulsji zawierającej komórki drożdży w kropelkach fazy wodnej, i na koniec dla drożdży uwięzionych w mikrokapsułkach na włóknach uzyskanych przez elektroprzędzenie odwróconej emulsji.

Fluorescencję wybarwionych komórek obserwowano z użyciem mikroskopu epi-fluorescencyjnego (Nikon, Eclipse E-50i) zaopatrzonego w kamerę wysokiej rozdzielczości CCD (Bassler, A102f), albo ultraszybką kamerę (pco.1200hs, PCO Imaging), wysokociśnieniową lampę rtęciową (Nikon, LHM 100C1), oraz filtry fluorescencyjne QDot (ex. 320-460nm, em. 550-570nm) – do obserwacji fluoresceiny w teście z użyciem FDA.

Utworzoną emulsję zawierającą mikrokapsułki z komórkami drożdży inkubowano z wodną zawiesiną FDA dla stwierdzenia aktywności metabolicznej komórek [94, 127]. Diocjan fluoresceiny (FDA) dyfunduje do wnętrza żywych metabolizujących komórek, w których pod działaniem enzymów hydrolitycznych, głównie esteraz tworzy się fluoresceina. Pojawienie się tego barwnika w komórkach obserwowanych z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego oznacza obecność komórek o aktywnym metabolizmie.

Roztwór podstawowy FDA przygotowano przez rozpuszczenie 5 mg FDA w 670 mg (1.0 ml) acetonu. Roztwór do fluorescencyjnego wybarwiania komórek przygotowano przez dodanie 50mg (60 μ l) roztworu podstawowego w acetonie do 950 mg wody. Świeżo przygotowany roztwór wodny (0.37 mg FDA/ml H₂O) używano do określenia aktywności metabolicznej komórek. Roztwory przechowywano w ciemności.

W początkowych testach zawiesinę komórek drożdży (4,4mg w 194 μ l wody) inkubowano z zawiesiną FDA (0.074 mg w 195 μ l H₂O) przez 120 min (Rys. 4-30) dla określenia aktywności metabolicznej. W następnym eksperymencie stwierdzono aktywność metaboliczną drożdży potraktowanych przez 5 min ultradźwiękami, a następnie wybarwianych zawiesiną FDA przez 30 min (Rys. 4-31).

Stwierdzono, że odwrócona emulsja zawierająca komórki drożdży zamknięte w mikrokapsułkach pozostawiona na noc z roztworem FDA wykazała jedynie śladową aktywność metaboliczną, prawdopodobnie wskutek toksyczności komórkowej głównego składnika emulsji – chlorku metylenu. Aby temu zapobiec zmodyfikowano procedurę, tak, aby maksymalnie skrócić czas kontaktu komórek z lipofilowym układem rozpuszczalników. Ponieważ czas kontaktu mógł być krytyczny dla uniknięcia zniszczenia błon biologicznych w komórkach wszystkie czynności od etapu mieszania zawiesiny komórek z organiczną poprzez mieszanie ultradźwiękowe składników emulsji aż do rozpoczęcia elektroprzędzenia prowadzono w czasie nie dłuższym niż 20 minut.

Wnioski: pomimo bardzo dobrej przeżywalności komórek w fazie wodnej stwierdzono konieczność zminimalizowania kontaktu komórek z odwróconą emulsją w związku z jej toksycznością oraz możliwość otrzymania mikrokapsulek zawieszonych w nanomikrowłóknach zawierających żywe komórki drożdży.

Podjęto także próbę optymalizacji wybarwienia fluorescencyjnego komórek drożdży z zastosowaniem diocjanu fluoresceiny (FDA) i jodku propydy (PI). Testy przeprowadzono na komórkach w zawieszynie i uwieczonych w mikrokapsułkach w nanowłóknach. Badania przeprowadzono w celu jednoczesnego oznaczenia komórek żywych i martwych w mikrokapsułkach oraz ich proporcji. Do badań użyto najpierw uśmierconych komórek drożdży (kalibracja metody), zawiesziny żywych komórek drożdży a następnie komórek drożdży uwieczonych w mikrokapsułkach w nanomikrowłóknach.

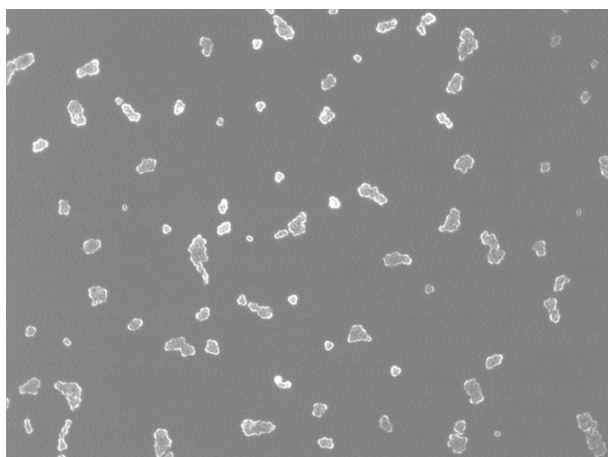
Testy wybarwienia fluorescencyjnego komórek drożdży przeprowadzono z jednoczesnym zastosowaniem barwnika do komórek żywych diocjanu fluoresceiny (FDA) i martwych jodku propydy (PI), stosowanych powszechnie do badań żywotności komórek [121, 76, 83, 112]. Jodek propydy (PI) nie przenika przez błony komórkowe żywych komórek, zaś po przeniknięciu do komórek martwych tworzy kompleksy z DNA, co wywołuje 20-30 krotne wzmocnienie fluorescencji. Reakcję tą wykorzystuje się do selektywnego wybarwienia komórek martwych (nekrotycznych – śmierć komórkowa indukowana zewnątrz lub apoptotycznych - śmierć komórki z przyczyn wewnętrznych).

Tabela 4-5. Optymalizacja parametrów wybarwienia żywych i martwych komórek. Czas inkubacji 66 godzin lub 5 dni.

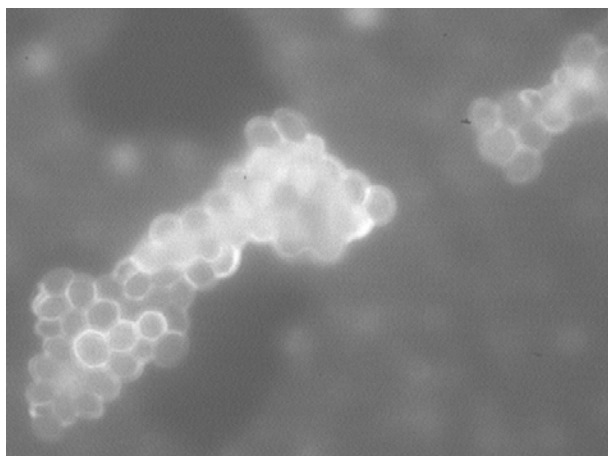
próbka drożdży	Zawieszina drożdży μl	Roztwór FDA μl	Roztwór PI μl
martwe	50	25	25
martwe	50	50	50
martwe	50	100	100
żywe	50	25	25
żywe	50	50	50
żywe	50	100	100

Fluorescencję wybarwionych komórek obserwowano w zestawie indentycznym, jak w pierwszej części badań. Testy wybarwienia z zastosowaniem jodku propydy (PI) wykonywano z użyciem filtrów fluorescencyjnych TRITC (ex. 540/25nm, em. 605/55nm).

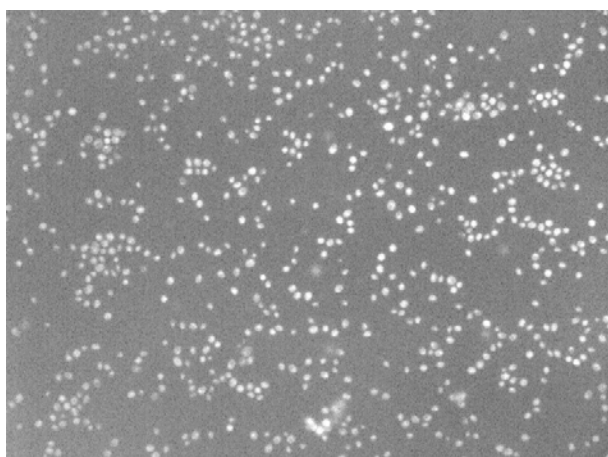
Dla skalibrowania metody z użyciem jodku propydy (PI) przeprowadzono testy wybarwienia komórek martwych. Komórki drożdży uśmiercono przez umieszczenie ich próbki w naczyniu z wrzącą wodą i pozostawieniu do wystygnięcia (około 30 min) Roztwór PI (0.02mg/ml) sporządzono przez rozpuszczenie 10 μl roztworu podstawowego PI (2 mg/ml) w 990μl wody dejonizowanej. Roztwór FDA (0.0012 mg/ml) przygotowano przez rozpuszczenie 20μl roztworu podstawowego FDA (5 mg FDA w 670 mg (1.0 ml) acetonu) w 4.20 ml wody dejonizowanej.



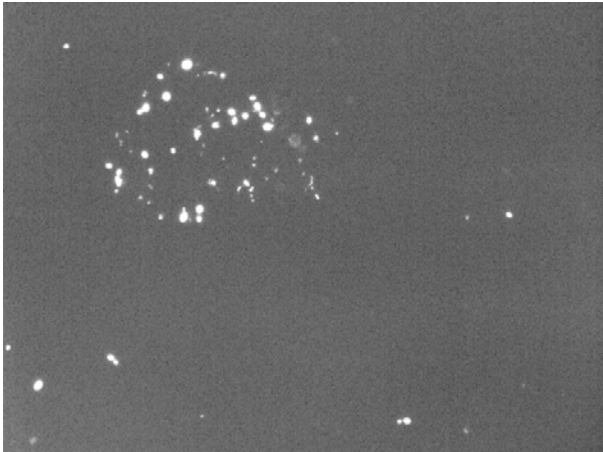
Rys. 4-30 Komórki drożdży inkubowane przez 120 min z dioctanem fluoresceiny (FDA) dla stwierdzenia aktywności życiowej/metabolicznej. Jasność fluorescencji jest proporcjonalna do aktywności metabolicznej. Widoczne aglomeraty komórek drożdży. Fluorescencja obserwowana z użyciem zestawu filtrów QDot (ex. 320-460 nm, em. 550-570nm). Powiększenie 20x.



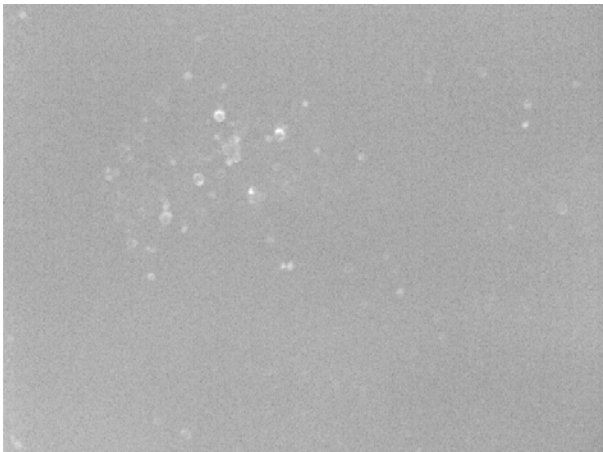
Rys. 4-31 Powiększenie aglomeratów komórek drożdży mieszanych ultradźwiękowo przez 5 min, a następnie inkubowane przez 30 min z dioctanem fluoresceiny (FDA) dla stwierdzenia aktywności metabolicznej. Jasność fluorescencji jest proporcjonalna do aktywności metabolicznej. Fluorescencja obserwowana z użyciem zestawu filtrów QDot (ex. 320-460 nm, em. 550-570nm). Powiększenie 100x.



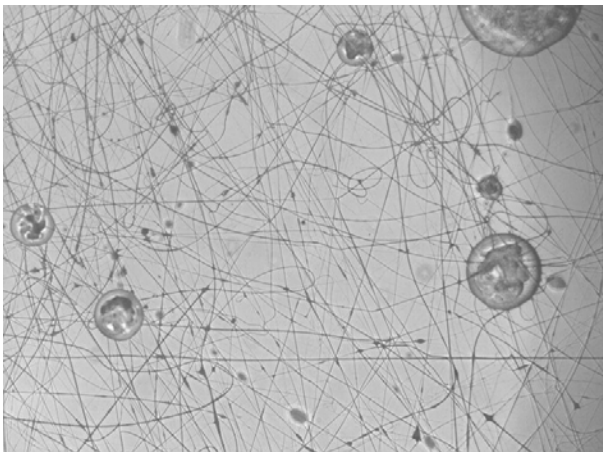
Rys. 4-32 Próbkę uśmierczonych komórek drożdży wybarwiona jodkiem propydyiny (PI). Fluorescencja praktycznie wszystkich komórek potwierdza poprawność zastosowanej metody wybarwienia. Widoczna jest fluorescencja kompleksu PI-DNA w jądrze komórkowym martwych komórek. Powiększenie 50x. 66 godzin inkubacji.



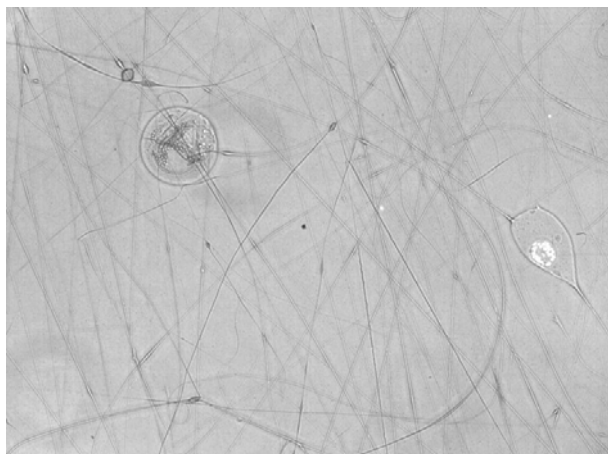
Rys. 4-33 Próbka żywych komórek drożdży inkubowanych 66 godzin z dioctanem fluoresceiny (FDA) dla stwierdzenia ich aktywności metabolicznej. Widoczna fluorescencja niektórych komórek w konglomeracie pokazuje ich aktywność metaboliczną. Powiększenie 50x. 66 godzin inkubacji.



Rys. 4-34 Próbka żywych komórek drożdży wybarwionych jodkiem propydy (PI). Widoczna w niektórych komórkach w konglomeracie fluorescencja kompleksu PI-DNA. Pokazuje ona śmierć niektórych komórek. Powiększenie 50x. 66 godzin inkubacji z PI.



Rys. 4-35 Komórki drożdży wewnątrz okrągłych mikrokapsulek zawieszonych na nanowłóknach. Powiększenie 20x. Obserwacja w świetle widzialnym.



Rys. 4-36 Komórki drożdży wewnątrz mikrokapsulek zawieszonych na nanowłóknach inkubowane 21 godzin z jodkiem propydyiny (PI) Widoczne zgrupowania martwych komórek. Fluorescencja wywołana powstaniem kompleksu PI-DNA charakterystyczna dla komórek martwych. Powiększenie 20x. Obserwacja fluorescencji PI złożona z obrazem w świetle widzialnym.



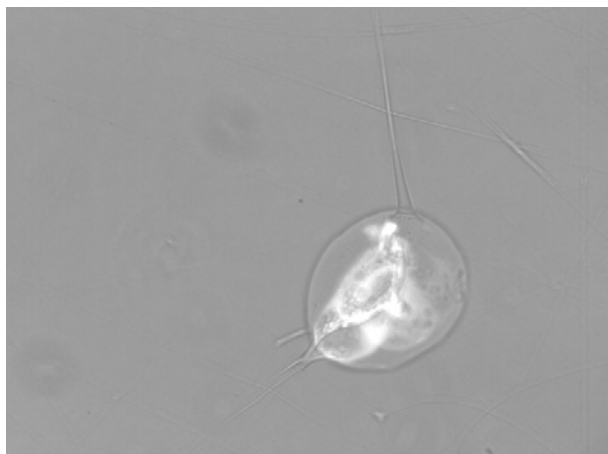
Rys. 4-37 Powiększenie wrzecionowatej mikrokapsulki zawierającej martwe komórki drożdży widoczne na poprzednim rysunku. Powiększenie 100x. Obserwacja w świetle widzialnym.

Dla oceny czułości metody dla każdej próbki wykonywano oznaczenia dla 3 różnych stężeń odczynników wybarwiających.

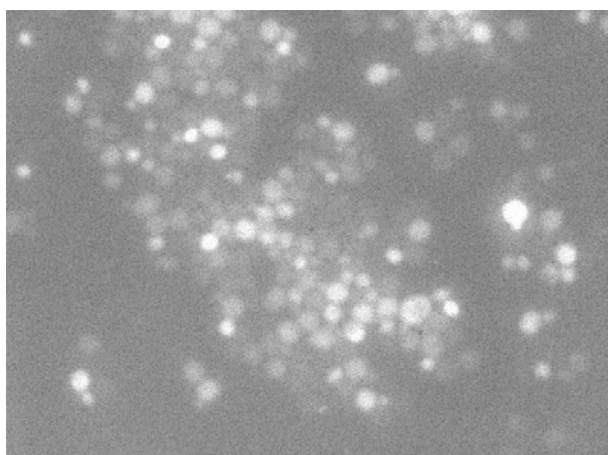
W zakresie badanych stężeń barwników nie stwierdzono pogorszenia wykrywalności. Użyte stężenie barwników fluorescencyjnych było wystarczające dla wybarwiania martwych komórek drożdży (Rys. 4-32), wybarwienie FDA wykazało brak żywych komórek. Około 100% komórek obserwowanych w świetle widzialnym uległo wybarwieniu PI – co dobrze ewaluuje użycie PI jako odczynnika wykazującego śmierć komórek.

Te same testy przeprowadzone dla żywych komórek pokazały aktywność metaboliczną wobec FDA pewnej ilości komórek (Rys. 4-33), wyznakowaniu PI uległa również pewna liczba martwych komórek (Rys. 4-34).

Przeprowadzone próby fotowycielania (photobleach) dla próbek wybarwionych z zastosowaniem FDA i PI. Stwierdzono, że fluorescencja otrzymana z PI (test śmierci) jest stabilna. Użycie światła widzialnego wobec kompleksów fluorescencyjnych skoncentrowanych w jądrze komórkowym i niedyfundujących z niego dawało dobre wyniki (4-krotne osłabienie fluorescencji w czasie 20 minut). W odróżnieniu od tego “test życia” ma znacznie mniejsze szanse sukcesu. Powstająca jako produkt metabolizmu FDA fluoresceina stopniowo dyfunduje na zewnątrz komórki, co obniża jej stężenie, pogarsza stosunek sygnał/szum i co za tym idzie wykrywalność. Również fotowycielanie (photobleach) dla oświetlanej ultrafioletem fluoresceiny jest znacznie intensywniejsze niż dla kompleksu PI-DNA.



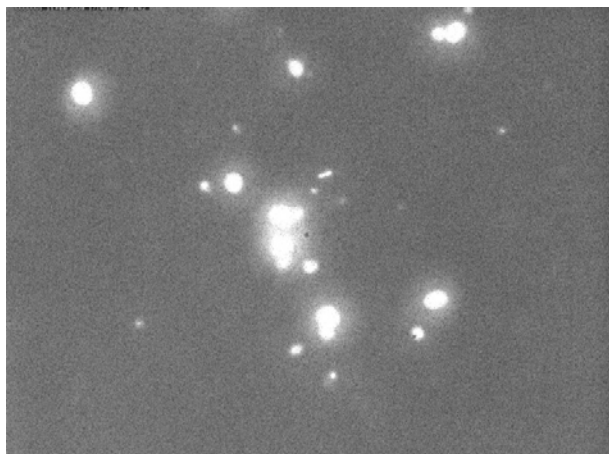
Rys. 4-38 Fluorescencja komórek drożdży wewnątrz mikrokapsulek zawieszonych na nanowłóknach inkubowanych 66 godzin z dioctanem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propydyiny (PI) dla stwierdzenia ich aktywności życiowej lub śmierci i 45 godzin z roztworem sacharozy jako pożywką. Widoczna fluorescencja wywołana aktywnością metaboliczną żywych komórek złożonej z obrazem w świetle widzialnym przechodzącym. Uwidoczniona mikrokapsulka nie zawierała komórek martwych (analogiczna obserwacja na fluorescencję PI dała wynik negatywny – czarne tło). Powiększenie 50x.



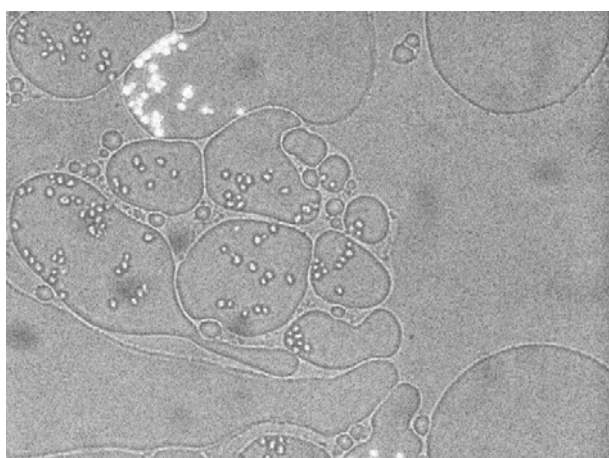
Rys. 4-39 Próbkę żywych komórek drożdży inkubowanych 10 minut z dioctanem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propydyiny (PI) dla stwierdzenia ich aktywności metabolicznej. Dla rysunku 15-18 zastosowano 33 krotnie większe stężenie FDA w porównaniu z poprzednimi rysunkami i takie samo stężenie PI. Widoczna fluorescencja niektórych komórek w konglomeracie pokazuje ich aktywność metaboliczną (94% komórek w próbce). Powiększenie 100x.

Generalnym wnioskiem z powyższych doświadczeń jest duża łatwość w obserwacji komórek martwych i trudność w obserwacji komórek żywych. Porównanie próbki komórek przed i po procesie elektroprzędzenia pozwala zauważyć, że łatwo widoczne martwe komórki pochodzą z trzech źródeł komórek: martwych od początku, żywych oraz uśpionych. Komórki latentne (uśpione) nie pokazują się w obrazie fluorescencyjnym, zaś fluorescencja komórek żywych jest słabo widoczna, łatwo zanika, oraz pochodzi tylko z początkowej populacji komórek żywych. Tak więc wykrycie nawet słabej aktywności metabolicznej komórek w mikrokapsułkach zawieszonych w biodegradowalnych nanowłóknach powinno być wystarczające do stwierdzenia przydatności metody do otrzymywania „pseudo-tkanek”.

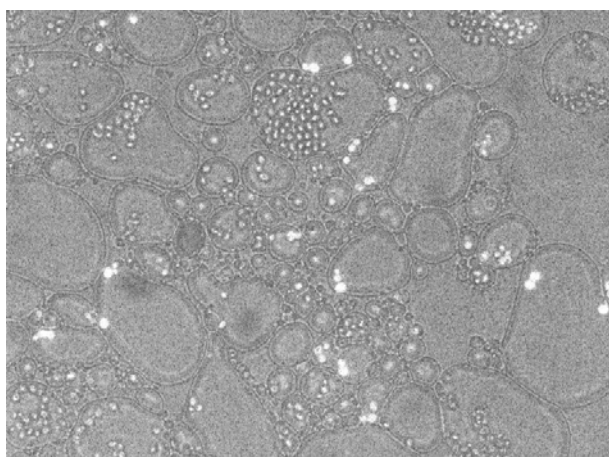
Wskazane powyżej trudności miały duży wpływ na wyniki eksperymentów mających na celu uzyskanie mikrokapsulek zawierających drożdże zawieszonych na biodegradowalnych nanowłóknach, będących modelem komórek ludzkich mających posłużyć jako „pseudo-tkanki” do zastosowań biomedycznych. Otrzymano mikrokapsułki zarówno kształtu doskonale okrągłego jak i wrzecionowatego (Rys. od 4-35 do 4-38) umieszczone wśród splecionych nano i mikrowłókien z biodegradowalnego poli(L-laktydu). Wybarwienie PI potwierdziło obecność pewnej populacji komórek martwych (Rys. 4-36) tworzących skupiska we wrzecionowatych mikrokapsułkach (Rys. 4-37) oraz brak nakładania się fluorescencji PI i FDA (możliwe zaistnienie artefaktów komórek żywych jako słabe świecenie komórek martwych w pokrywającym się zakresie). Komórki latentne były ukryte wewnątrz mikrokapsulek, w środowisku nanowłókien niewidoczne i niepoliczalne



Rys. 4-40 Próbką żywych komórek drożdży inkubowanych 10 minut z dioctanem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propydyiny (PI) dla stwierdzenia ich aktywności metabolicznej. Zastosowano 33 krotnie większe stężenie FDA w porównaniu z poprzednimi rysunkami i takie samo stężenie PI. Widoczna w niektórych komórkach w konglomeracie fluorescencja kompleksu PI-DNA. Pokazuje ona śmierć niektórych komórek (6% komórek w próbce). Powiększenie 100x.



Rys. 4-41 Komórki drożdży zamknięte w mikropęcherzykach fazy wodnej w odwróconej emulsji po 35 minutach od utworzenia emulsji, inkubacja z dioctanem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propydyiny (PI) dla stwierdzenia ich aktywności metabolicznej. Zastosowano 33 krotnie większe stężenie FDA w porównaniu z poprzednimi rysunkami i takie samo stężenie PI. Widoczna w niektórych komórkach w konglomeracie fluorescencja kompleksu PI-DNA. Pokazuje ona śmierć niektórych komórek. Ciemne komórki, obserwowane w świetle widzialnym nie są martwe. Powiększenie 50x. Obserwacja fluorescencji kompleksu PI-DNA złożona z obrazem w świetle widzialnym.



Rys. 4-42 Komórki drożdży zamknięte w mikropęcherzykach fazy wodnej w odwróconej emulsji po 150 minutach od utworzenia emulsji, inkubacja z dioctanem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propydyiny (PI) dla stwierdzenia ich aktywności metabolicznej. Zastosowano 33 krotnie większe stężenie FDA w porównaniu z poprzednimi rysunkami i takie samo stężenie PI. Widoczna w niektórych komórkach w konglomeracie fluorescencja kompleksu PI-DNA. Pokazuje ona śmierć niektórych komórek. Ciemne komórki, obserwowane w świetle widzialnym nie są martwe. Powiększenie 50x. Obserwacja fluorescencji kompleksu PI-DNA złożona z obrazem w świetle widzialnym.

Wykazano obecność mikrokapsulek o intensywnym metabolizmie niezawierających w populacji martwych komórek (Rys. 4-38).

Dla określenia stopnia przeżywalności komórek drożdży w emulsji przeprowadzono dalsze testy polegające na obserwacji pod mikroskopem komórek drożdży w emulsji.

W pierwszym etapie dla stwierdzenia proporcji żywych i martwych komórek zastosowano wybarwienie z użyciem typowego stężenia PI (25µl roztworu podstawowego 0.02mg/ml) i 33 razy wyższego od stosowanego wcześniej stężenia roztworu FDA (1 µl roztworu 5mg/ml) dodanych do zawiesiny drożdży (100 µl 10% roztworu). Po 5-10 minutach nastąpiło wybarwienie zarówno komórek żywych – około 94% (Rys. 4-39) jak i martwych około 6% (Rys. 4-40). Następnie według wcześniejszej procedury wykonano emulsję, dodano odczynniki wybarwiające i rejestrowano zachowanie komórek drożdży w czasie. Stwierdzono, że niektóre z komórek były martwe już po 35 minutach (wybarwienie PI, jasne komórki na Rys. 4-41), inne żyły nawet po 150 minutach przebywania w emulsji (ciemne komórki, niewybarwione PI na Rys. 4-42). Stwierdzono również, że śmierć komórek następowała w obrębie jednego pęcherzyka emulsji tzn. w obrębie małych pęcherzyków wszystkie komórki były albo żywe albo martwe, w obrębie większego pęcherzyka zarejestrowano przesuwanie się „fali śmierci komórek” w czasie. Istnieje możliwość, że jest to efekt komunikacji między umierającymi komórkami wewnątrz jednego pęcherzyka, ale teza taka wymagałaby dalszych badań.

4.8.3 Emulsja zawierająca erytrocyty

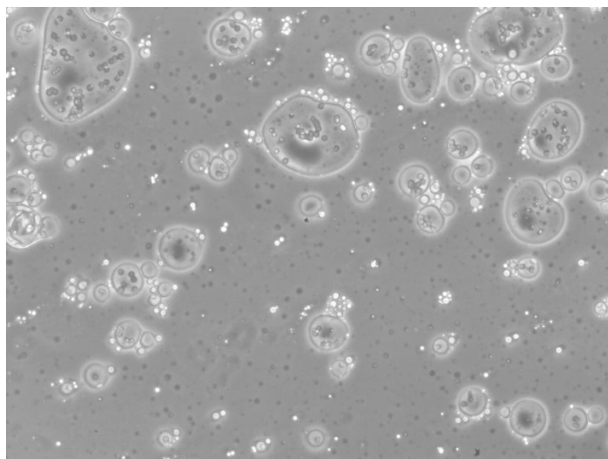
W dalszych badaniach nad otrzymaniem emulsji zawierającej komórki jako modelowe komórki ludzkie przyjęto erytrocyty. Poszukiwano właściwego antykoagulanta i jego stężenie w fazie wodnej. Celem badań było znalezienie optymalnych warunków do uzyskania odwróconej emulsji zawierającej erytrocyty, a następnie zbadanie możliwości uzyskania mikrokapsulek.

Jako prostą metodę rozpoznawania “przeżywalności” erytrocytów przyjęto obserwację mikroskopową ich kształtu. Ponieważ ludzkie erytrocyty nie posiadają jądra komórkowego, a co za tym idzie nie wykazują metabolizmu ani nie posiadają DNA nie można ich wybarwiać fluorescencyjnie. Erytrocyty w odróżnieniu od komórek drożdży nie posiadają ściany komórkowej, a jedynie błonę komórkową. Komórki drożdży są odporniejsze i wytrzymalsze od typowych komórek ludzkiego organizmu i wyznaczały dolną granicę możliwości przeżycia ludzkich komórek, zaś bardzo nieodporne (nawet na zmiany stężenia elektrolitów) erytrocyty wyznaczały dolną granicę przeżycia. Uszkodzenia erytrocytów objawiające się zmianą kształtu, rozerwaniem błony komórkowej, albo wylaniu zawartości są stosunkowo szybkim i łatwym testem do przeprowadzenia z użyciem mikroskopu optycznego.

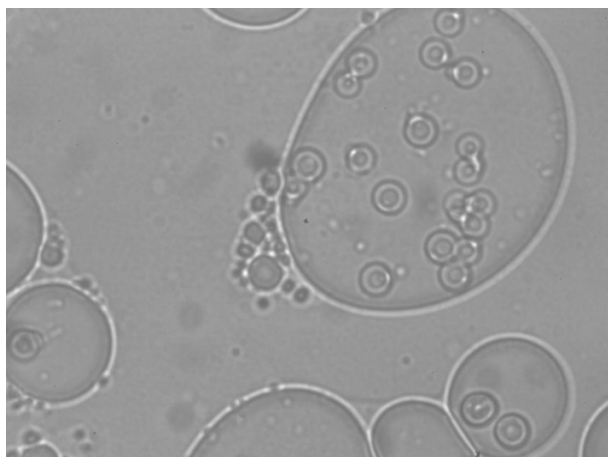
Stwierdzono, że typowy czas otrzymywania emulsji jest nieoptymalny i powoduje rozerwanie erytrocytów. Stwierdzono, że erytrocyty ulegały rozerwaniu, gdy komórki drożdży dobrze znosiły 5 minut mieszania ultradźwiękowego. Stwierdzono, że 2 minuty ekspozycji na ultradźwięki nie powoduje znaczących uszkodzeń erytrocytów. Stwierdzono bardzo intensywny szok osmotyczny (rozrywanie komórek i ich deformacje) dla erytrocytów umieszczonych w wodzie destylowanej. Zastosowano 1% roztwór alginianu i 0,9% NaCl (stężenie odpowiadające soli fizjologicznej) jako fazę wodną niepowodującą szoku osmotycznego erytrocytów. Stwierdzono bardzo intensywne wykrzepianie erytrocytów,

podjęto próby syntezy i zastosowania cytrynianu monosodowego jako antykoagulantu. Stwierdzono, że użycie soli disodowej kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Na_2EDTA) jako antykoagulantu pozwala całkowicie wyeliminować problem wykrzepiania. Otrzymano emulsje zawierające prawidłowe erythrocyty (Rys. 4-43 i 4-44).

Wnioski: znaleziono układ umożliwiający otrzymanie emulsji z erythrocytów.



Rys. 4-43 Modelowe komórki ludzkie – erythrocyty zamknięte w mikropęcherzykach fazy wodnej w odwróconej emulsji po 2 minutach mieszania ultradźwiękowego. Wyróżnić można poszczególne erythrocyty zamknięte w mikropęcherzykach. Powiększenie 20x. Zastosowano kontrast fazowy.



Rys. 4-44 Powiększenie erythrocytów zamkniętych w mikropęcherzykach fazy wodnej w odwróconej emulsji po 2 minutach mieszania ultradźwiękowego. Wyróżnić można poszczególne erythrocyty zamknięte w mikropęcherzykach. Erythrocyty nie są uszkodzone i mają poprawne kształty. Powiększenie 100x.

4.8.4 Emulsja zawierająca cząstki fluorescencyjne

Przeprowadzono szereg testów, w których pokazano możliwość umieszczenia cząstek fluorescencyjnych wewnątrz mikropęcherzyków fazy wodnej w odwróconej emulsji. Próby otrzymania biodegradowalnych nanowłókien zawierających mikrokapsułki fazy wodnej z cząstkami fluorescencyjnymi nie powiodły się. Powodem nieudanych prób był fakt, że polimer enkapsulujący roztwór barwnika fluorescencyjnego rozpuszczał się w chlorku metylenu tworzącym fazę organiczną odwróconej emulsji, a sam barwnik wylewał się do fazy wodnej mikrokapsułki. Użycie nierozpuszczalnych cząstek o usieciowanej powierzchni pozwoliłoby rozwiązać ten problem.

4.8.5 Elektroprądzenie komórek ludzkich

Układy kompozytowe zawierające komórki ludzkie uporządkowane w strukturze biodegradowalnego polimeru „pseudo-tkanki” są perspektywnym kierunkiem rozwoju medycyny regeneracyjnej. Zewnętrznie namnożone odpowiedniego rodzaju komórki pacjenta (np. chondrocyty) są już obecnie umieszczane w uszkodzonej tkance (np. tkance chrzęstnej

kolana), gdzie ich zadaniem jest przeprowadzenie procesu naprawy. Podawanie zawiesiny komórek nie przynosi do końca oczekiwanego efektu, niezorganizowane komórki mają skłonność do opuszczania regenerowanego organu. Zastosowanie komórek uwieczonych w mikrokapsułkach powinno rozwiązać ten problem, zaś użycie biodegradowalnego i biozgodnego polimeru do wytworzenia struktury kapsułek i mikro-nanowłókien, które je przytrzymują umożliwi stopniową integrację komórek w odbudowywaną tkankę.

Celem badań było znalezienie linii komórkowej najbardziej odpornej na niekorzystne warunki inkubacji, umieszczenie wybranej linii komórkowej w emulsji, a następnie w mikrokapsułkach w nanowłóknach i stwierdzenie przeżywalności przez komórki kolejnych stadiów procesu enkapsulacji: od transportu przez przechowywanie, utworzenie emulsji, aż do umieszczenia w mikrokapsułkach zawieszonych na nanowłóknach.

Komórki inkubowano w typowej pożywce przystosowanej do atmosfery zawierającej 5% CO₂, ale w przy atmosferycznym ciśnieniu CO₂, w temp. 37°C. Obserwacje mikroskopowe polegały na stwierdzeniu, czy dane linie komórkowe zachowały „normalny” dla siebie wygląd mikrobiologiczny. Testy życia i śmierci komórek wykonywano z zastosowaniem jodku propydydy PI (wybarwia komórki martwe) oraz diocetanu fluoresceiny FDA (wybarwia komórki żywe).

Przebadano cztery linie komórek:

- A. Jurkat – komórki białaczki limfatycznej (ludzkie).
- B. MZ 10B4 – komórki podścieliska szpiku kostnego (macierzyste, mysie).
- C. D32- linia mieloidalna (ludzkie).
- D. HeLa – komórki raka jajnika (ludzkie).

Pierwsze obserwacje przeprowadzono po około 2 godzinach transportu (w temp. około 0°C) i inkubacji w temp. 37°C. Zarówno komórki (B) jak i (D) nie wykazały normalnego obrazu – przestały się płóżyć i odkleiły się. Zaniechano dalszych prób dla tych linii. Dla linii (A) i (C) prowadzono testy życia i śmierci w czasie do pięciu dni. Wykonano również testy otrzymywania emulsji i utworzenia włókien z mikroenkapsulowanymi komórkami.

Po kilku godzinach inkubacji sporządzono zawiesinę komórek (C) w 0,9% NaCl (roztwór fizjologiczny, dla uniknięcia szoku osmotycznego) i 1% roztworze alginianu sodu (subst pow. czynna) – 120mg + (faza organiczna odwróconej emulsji 1081,6 g) + EtOAc 220mg. Zastosowano emulsyfikację ultradźwiękową (2 min) – stwierdzono obecność integralnych komórek w fazie wodnej odwróconej emulsji. Podczas procesu elektroprzędzenia najlepsze wyniki uzyskano dla 15kV.

Jako fazę ciągłą (organiczną) odwróconej emulsji: zastosowano roztwór zawierający 250 mg (0,22mmol) seskwioleinianu sorbitanu (sesquioleate sorbitan) jako surfaktanta, 515mg kopolimeru akrylanu z akrylanem etanolaminy (Eudragit RSPO, Rohm) jako stabilizatora emulsji i 1250mg poli(L-laktydu) (PLLA, Biomer L900, Mw=200kDa; Biomer) którego funkcją było utworzenia biodegradowalnego rusztowania komórkowego, które pozostawiono na noc do rozpuszczenia w 19 ml (25g) chlorku metylenu CH₂Cl₂.

Nanowłókna zawierające mikrokapsułki z komórkami wybarwiano z użyciem FDA rozpuszczonego w alkalicznej pożywce. Stwierdzono bardzo silną fluorescencję zarówno pożywki jak i komórek. Generalnie silniej świeciły komórki. Pożywka o odczynie alkalicznym samodzielnie powodowała hydrolizę FDA, jak również zapewniała wydajną fluorescencję fluoresceiny wytworzonej przez komórki z FDA. Dodatkowo PI w pożywce nie

dało pozytywnych wyników, nie wybarwiły się komórki martwe. Generalnie wynik testów przeżycia komórek w mikrokapsułkach nie dał jasnej odpowiedzi, ani czy przeżyły one proces emulsyfikacji i elektroprzędzenia, ani czy po procesie tym były martwe.

- Po 24 godzinach badanie próbki komórek (C) pokazało większość żywych, podczas gdy (A) przeżyły w około 90%. Wykonano emulsję a następnie włókna z zastosowaniem (A).
- Po 72 godzinach komórki (C) – bufor zmienił barwę, pojawiło się dużo martwych komórek, niewielka ilość żywych. Układ został zainfekowany, prawdopodobnie pleśnią.
- Po 72 godzinach utworzono dwie następne emulsje z (A), które następnie wybarwiono a) FDA, b) PI, c) FDA i PI stwierdzono, że w emulsji PI wybarwia bardzo szybko - 2-3 min. Wykazano obecność w pęcherzykach fazy wodnej odwróconej emulsji martwych komórek.

Ponieważ do wybarwiania użyto FDA w 0,9% NaCl (a nie w pożywce), to nie uzyskano świecenia tła, wytworzona przez żywe komórki fluoresceina świeciła słabo. Niektóre pęcherzyki wykazywały silniejszą fluorescencję a niektóre słabszą (pęcherzyki zawierały zbuforowaną alkaiczną pożywkę, która samodzielnie mogła hydrolizować FDA).

- Po czterech dniach wykonano testy życia i śmierci dla (A). Stwierdzono obecność żywych komórek. Po pięciu dniach testy z użyciem FDA i PI wykazały około 5% żywych komórek.

Opisane wyżej testy pozwoliły na wytypowanie 1-2 ludzkich linii komórkowych, z których uzyskano odwróconą emulsję, a następnie utworzono mikrokapsułki zawierające komórki zawieszona na biodegradowalnym rusztowaniu z mikro-nanowłókien. Nie uzyskano jednoznacznych rezultatów, świadczących o poziomie przeżycia komórek w mikrokapsułkach.

4.8.6 Podsumowanie elektroprzędzenia komórek

Wykonano szereg nowych materiałów zawierających żywe komórki drożdży oraz przeprowadzono testy pozwalające przypuszczać, że będzie możliwe otrzymanie materiałów zawierających komórki ludzkie. Użycie komórek ludzkich w badanych warunkach nie dało pozytywnych rezultatów. Prawdopodobnie jeden ze składników emulsji uszkadzał któryś z elementów materiału komórkowego – przypuszczalnie błonę komórkową.

5 Badania nad procesem elektroprzędzenia gliceryny

Celem badań eksperymentalnych prowadzonych dla wodnych roztworów gliceryny było poszukiwanie parametrów istotnych dla modelowania procesu elektroprzędzenia. Badanie niestabilności strugi cieczy newtonowskiej bez przemiany fazowej stanowi modelową konfigurację ułatwiającą poszukiwanie wpływu podstawowych parametrów cieczy (lepkość, napięcie powierzchniowe) i samego procesu (potencjał elektryczny, wydatek cieczy) na powstawanie niestabilności toru strugi. Badania przeprowadzono w dwojaki sposób: ze stałym wydatkiem roztworu, a zmiennymi napięciem i stężeniem roztworu, oraz ze zmiennym wydatkiem i stałym napięciem i stężeniem roztworu. Wyjaśnienie tego podejścia przedstawione jest wraz z omówieniem innych szczegółów poniżej.

5.1 Badania ze stałym wydatkiem

Stałym parametrem w eksperymencie w pierwszym etapie badań był wydatek masowy 400 μ l/godzinę, natomiast uwagę skupiono na określeniu, jak zmienia się proces w zależności od zmian dwóch innych parametrów:

- potencjału pomiędzy igłą dostarczającą roztwór do elektroprzędzenia i targetem, oraz
- zawartości gliceryny w roztworze.

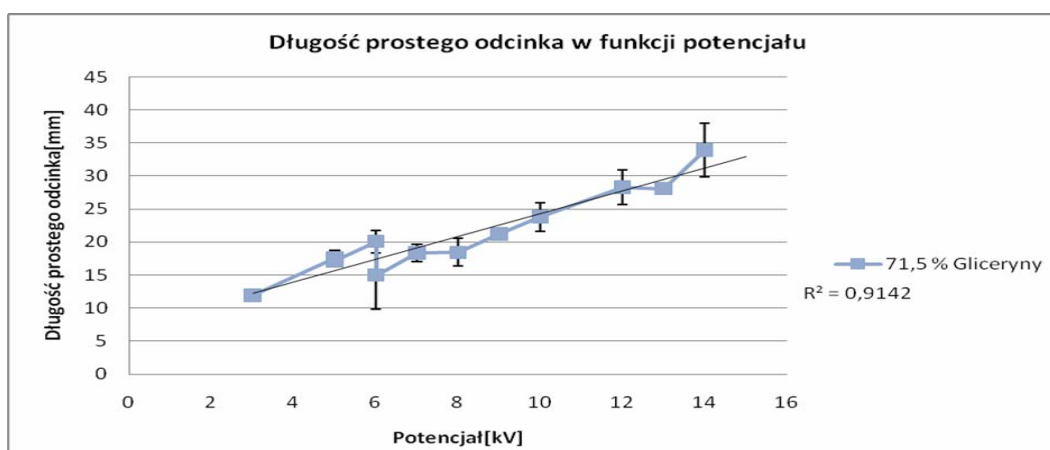
Pierwszy z parametrów był wybrany standardowo – stanowi podstawową wielkość decydującą o całym procesie. Jego wartości zmieniane były w zakresie od 3 kV do 20kV. Wybór drugiego z parametrów wynikał z faktu, że w modelu teoretycznym opracowanym w zakładzie Rea lizującym główną część projektu zakłada się stałość masy, tymczasem w szeroko stosowanych do elektroprzędzenia materiałach następuje odparowanie rozpuszczalników. Wybór gliceryny pozwala na istotne zbliżenie warunków procesu w eksperymencie i modelu. Ponieważ przy wyższych stężeniach gliceryny lepkość roztworu uniemożliwia elektroprzędzenie, zatem przyjęto procentową jej zawartość w roztworze (% masowy): 71,5%; 66,7%; 61,9% i 52,7%. Ponieważ czystej gliceryny nie poddaje się procesowi elektroprzędzenia, więc dodawano do niej roztwór PEO poli(tlenku etylenu) o stężeniu 3% w stałej proporcji 1/3. Eksperymenty przeprowadzono z następującym materiałem: poli(tlenek etylenu), PEO $M_w \approx 200,000$ Da (Aldrich), gliceryna 99,5% cz.d.a (POCH), woda dejonizowana. W tabeli 5-1 podane są zmierzone wartości lepkości dynamicznej gliceryny oraz jej roztworów użytych w eksperymentach.

Proces elektroprzędzenia był rejestrowany za pomocą szybkiej kamery typu PCO (rejestracja najczęściej z prędkością 200 klatek na sekundę), a następnie obrazy analizowano dla znalezienia prostego odcinka strugi oraz kąta rozwarcia wirującej strugi materiału. Arbitralnie przyjęto, że analizowanymi punktami strugi są te, które powtarzają się najczęściej w serii 200-1000 zarejestrowanych obrazów. W przypadku oscylacji strugi analizowano większą ilość zdjęć. Dla oszacowania błędów analizy notowano również alternatywne położenia punktów strugi (o zbliżonej częstości występowania) i wyznaczano dla nich wartości kąta i odcinka prostego.

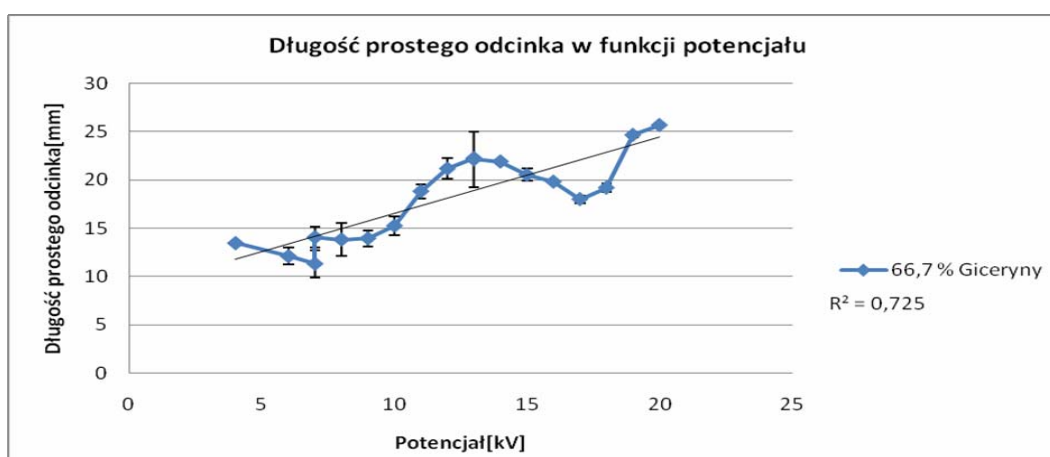
Wartości prostego odcinka wykazywały oscylacje zależne zarówno od napięcia jak i stężenia gliceryny. Na 5-1 przedstawiono zależność długości prostego odcinka od potencjału dla procesu elektroprzędzenia 71,5% roztworu gliceryny. Układ wykazywał jedynie niewielkie oscylacje, zatem można przyjąć, że zachodzi proporcjonalny wzrost długości prostego odcinka strugi do wzrostu potencjału. Jak wynika z rysunków 5-2 do 5-4, podobne spostrzeżenia wynikają z eksperymentów przeprowadzonych dla niższych stężeń gliceryny. Dla wygody wszystkie wykresy zebrano także na rysunku 5-5.

Tabela 5-1. Zestawienie wartości charakteryzujących lepkość dynamiczną elektroprzędzonych roztworów gliceryny.

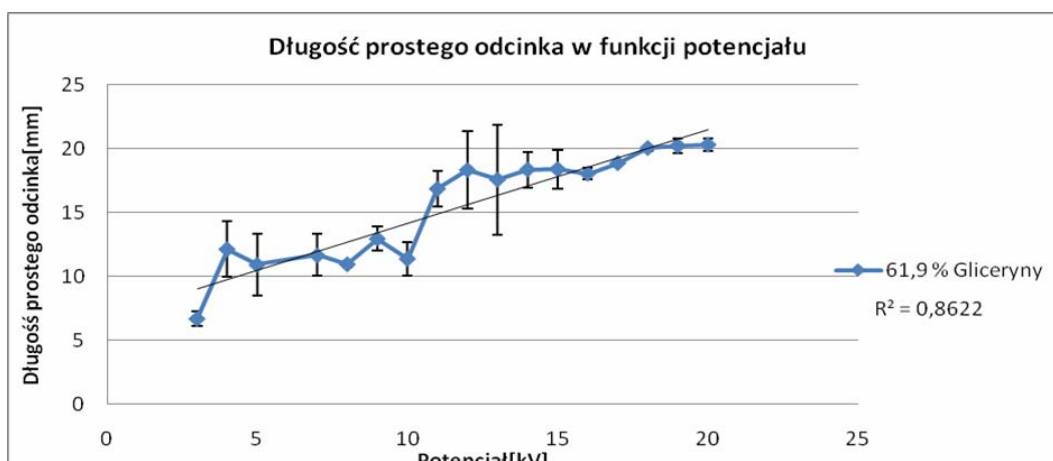
	Lepkość dynamiczna[Pa·s]			Błąd względny[%]		
	23°C	24°C	25°C	23°C	24°C	25°C
99,5 % gliceryny	538,74	495,40	453,97	0,31%	0,51%	0,63%
71,5 % gliceryny	35,65	33,70	31,77	0,33%	0,14%	0,50%
66,7 % gliceryny	31,70	30,25	28,79	0,01%	0,35%	0,23%
61,9 % gliceryny	17,82	16,90	16,18	0,25%	0,47%	0,39%
52,7 % gliceryny	13,63	13,48	12,52	0,14%	0,23%	0,26%



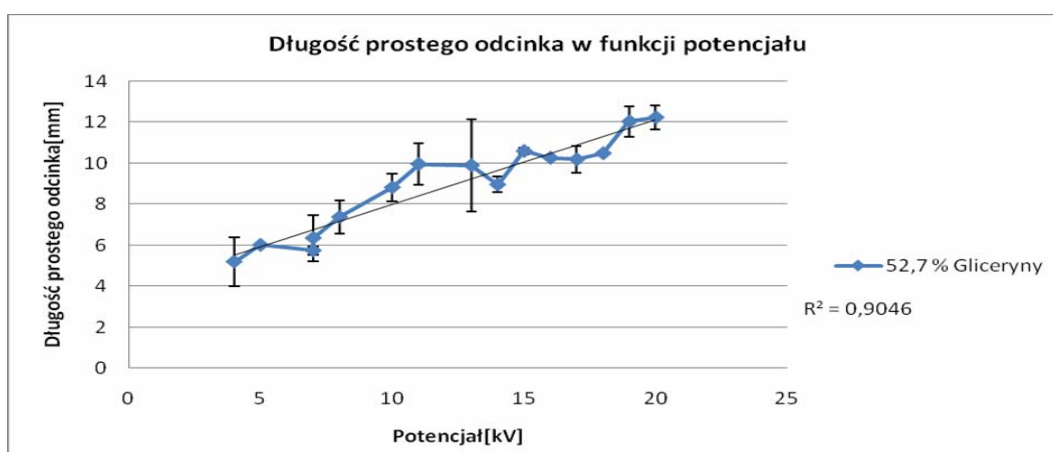
Rys. 5-1 Zależność długości prostego odcinka od potencjału w elektroprzędzeniu 71,5% roztworu gliceryny.



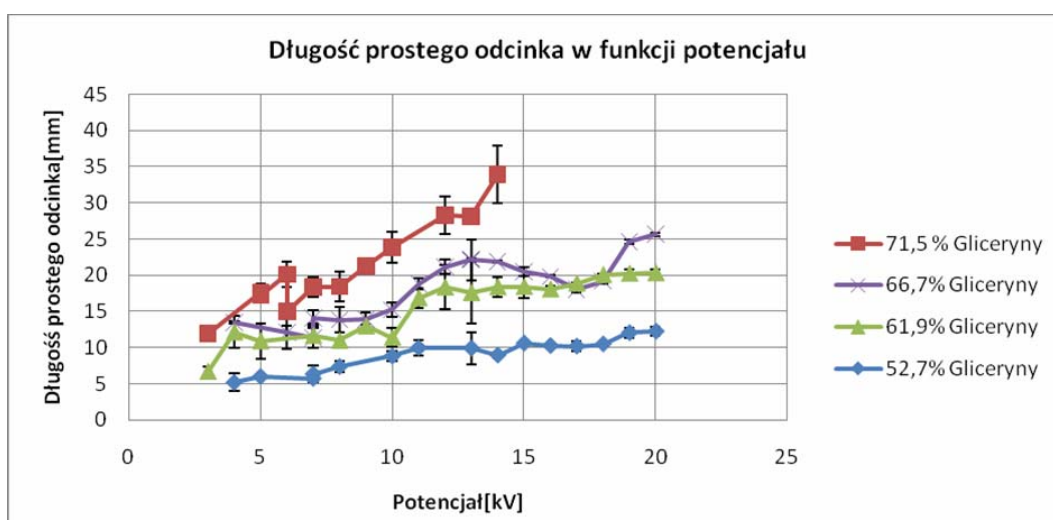
Rys. 5-2 Zależność długości prostego odcinka od potencjału w elektroprzędzeniu 66,7% roztworu gliceryny.



Rys. 5-3 Zależność długości prostego odcinka od potencjału w elektroprzędzeniu 61,9% roztworu gliceryny.



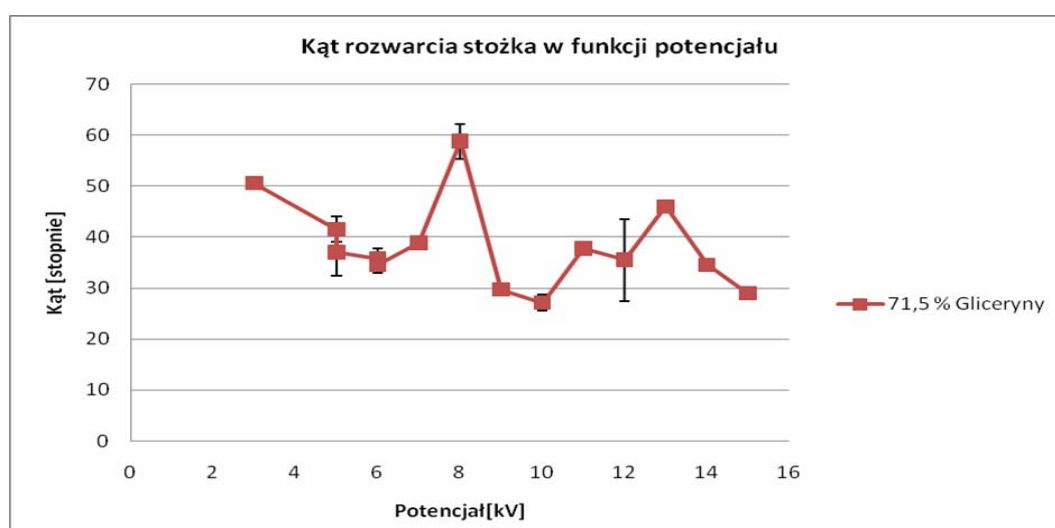
Rys. 5-4 Zależność długości prostego odcinka od potencjału w elektroprzędzeniu 52,7% roztworu gliceryny.



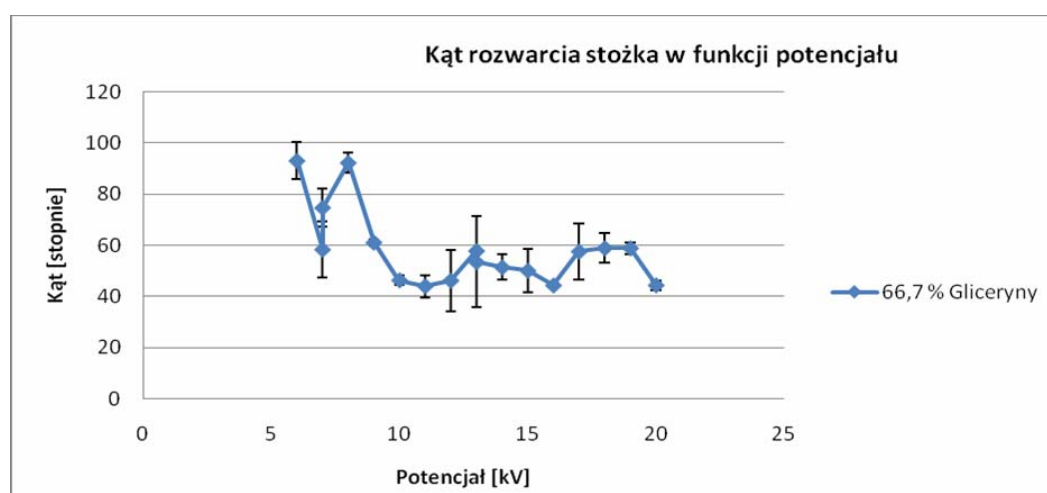
Rys. 5-5 Zbiorczy wykres zależności długości prostego odcinka od potencjału w elektroprzędzeniu roztworu gliceryny.

Można stwierdzić, że w każdym przypadku długość prostego odcinka strugi rosła w procesie elektroprzędzenia ze wzrostem wartości siły „wyciągającej” roztwór z dyszy. Pomimo pewnych oscylacji układu, w odnotowanym zakresie błędów pomiarowych dane można dopasować z zadowalającą dokładnością (91%-72%) do zależności liniowej i przyjąć proporcjonalną zależność od napięcia.

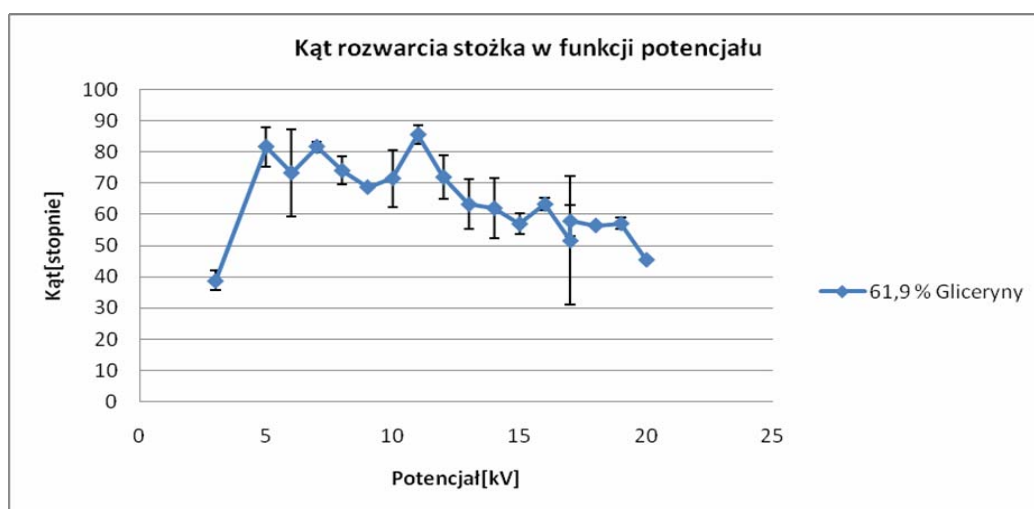
Długość prostego odcinka strugi zależy również od lepkości roztworu, którą w eksperymentach odzwierciedla stężenie gliceryny. Wraz ze wzrostem stężenia obserwowano wzrost długości prostego odcinka – przy wypływie bardziej lepkie roztwory tworzyły dłuższe proste odcinki i później ulegały zaburzeniom prowadzącym do końcowego tworzenia stożka wirującego materiału. Wyznaczone wartości kąta rozwarcia stożka w funkcji potencjału są pokazane na rysunkach 5-6 do 5-10 dla czterech badanych stężeń gliceryny



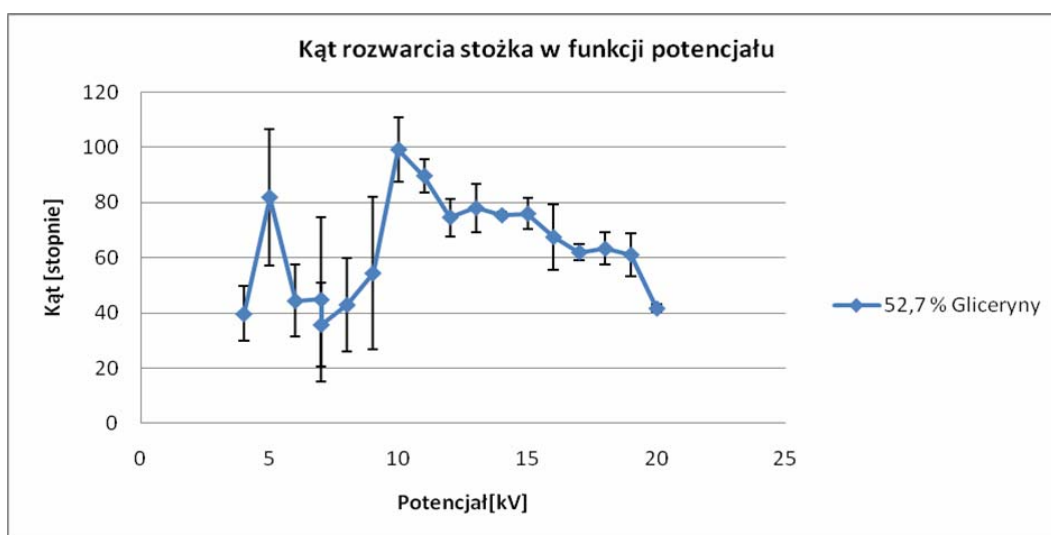
Rys. 5-6 Zależność wielkości kąta rozwarcia stożka od napięcia w elektroprzędzeniu 71,5% roztworu gliceryny.



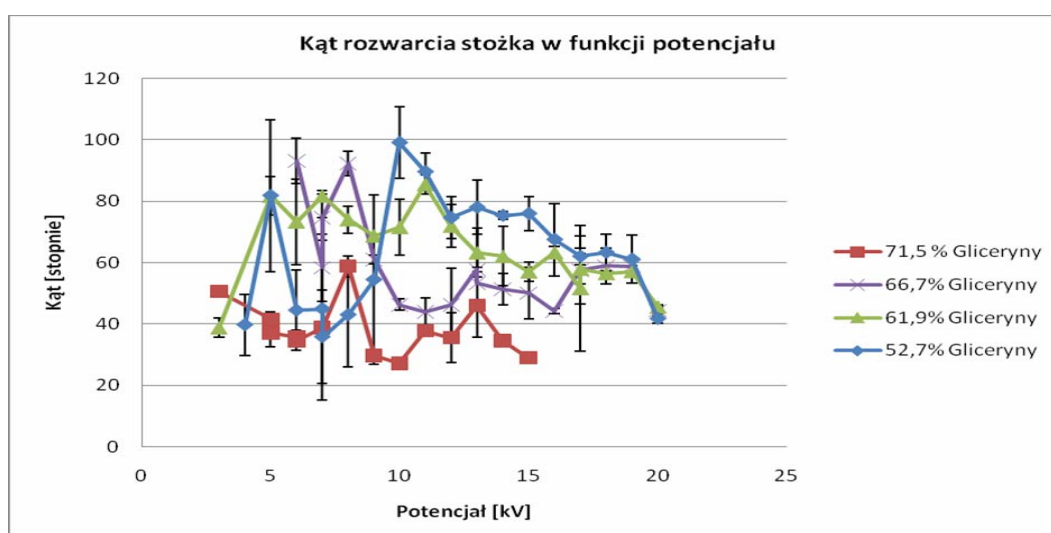
Rys. 5-7 Zależność wielkości kąta rozwarcia stożka od napięcia w elektroprzędzeniu 66,7% roztworu gliceryny.



Rys. 5-8 Zależność wielkości kąta rozwarcia stożka od napięcia w elektroprzędzeniu 61,9% roztworu gliceryny.



Rys. 5-9 Zależność wielkości kąta rozwarcia stożka od napięcia w elektroprzędzeniu 52,7% roztworu gliceryny.

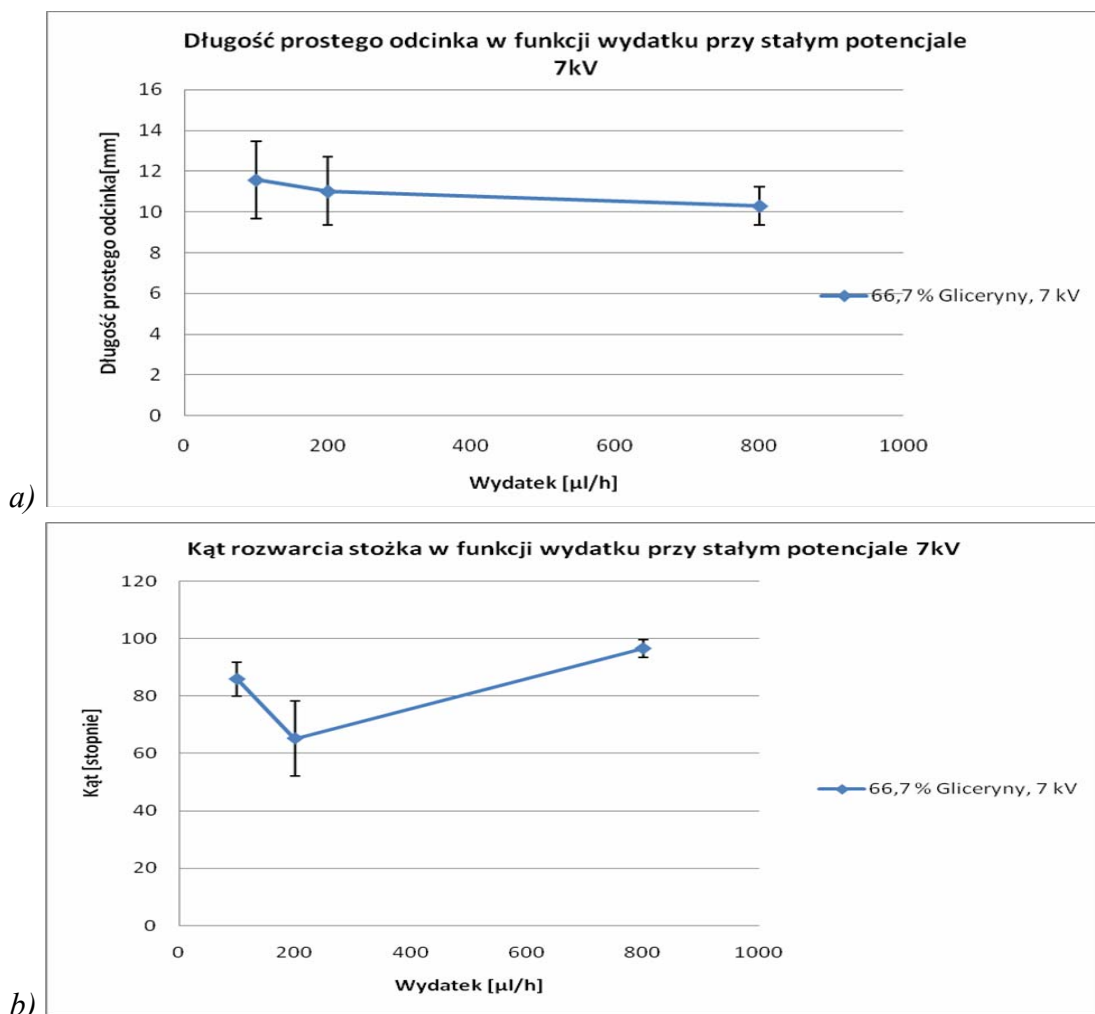


Rys. 5-10 Zbiorczy wykres zależności wielkości kąta rozwarcia stożka od napięcia w elektroprzędzeniu roztworu gliceryny dla czterech badanych stężeń gliceryny w roztworze.

Uzyskane w procesie elektroprzędzenia wartości kąta rozwarcia stożka wirującej strugi, wyznaczone z analizy obrazów, podlegają bardzo silnym oscylacjom. Dla otrzymanych wyników nie można było nakreślić linii trendu. Uzyskane w poszczególnych pomiarach wartości wykazywały bardzo duże różnice. Na rysunkach jest to zilustrowane przez duże słupki błędów. Wydaje się, że kąt rozwarcia stożka wykazywał tendencję do zmniejszania się ze wzrostem napięcia. Oznacza to, że ze wzrostem siły działającej na strugę wykazywała ona mniejszą tendencję do wirowania. Trendem widocznym na zbiorczym wykresie jest zmniejszanie się kąta rozwarcia stożka ze wzrostem stężenia gliceryny w roztworze (wzrost lepkości powodował mniejszą skłonność strugi do wirowania).

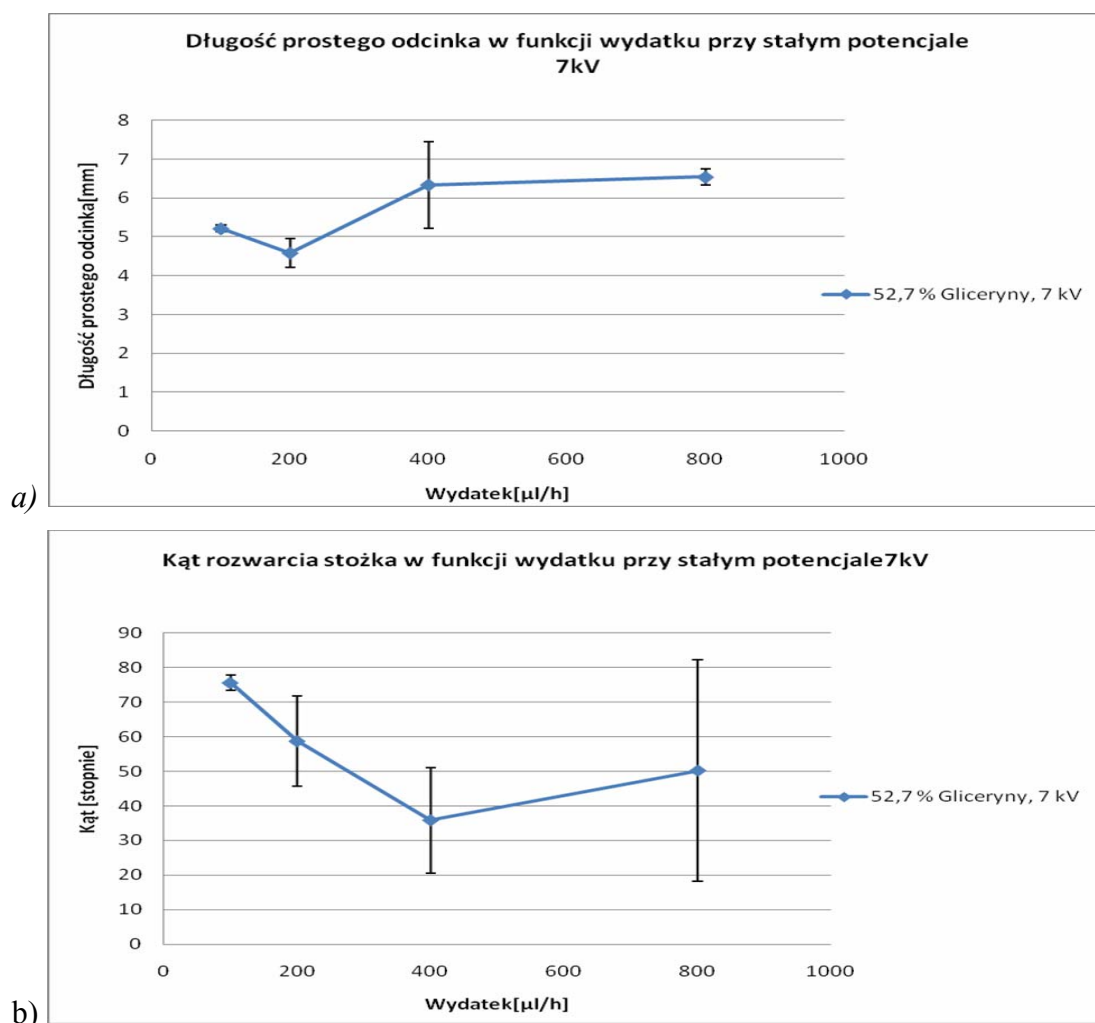
5.2 Badania ze zmiennym wydatkiem

W celu sprawdzenia, czy wydatek masowy – jeden z podstawowych parametrów układu – ma wpływu na otrzymane wyniki, przeprowadzono odpowiednią analizę badając efekty w postaci długości odcinka prostego strugi i kąta rozwarcia jej stożka dla dwóch stałych wartości potencjału: 7kV i 17kV. Zakres wydatków masowych (100-800 μ l/godzinę), stosowanych w procesie elektroprzędzenia, był typowy, a poprzez jego zmiany przy stałym stężeniu gliceryny i stałym potencjale kontrolowano jego wpływ na wyniki elektroprzędzenia.



Rys. 5-11 Zależność a/ długości prostego odcinka i b/ kąta rozwarcia stożka od wydatku w procesie elektroprzędzenia 66,7% roztworu gliceryny dla zakresu wydatków 100-800 μ l/godzinę, zastosowany potencjał 7kV.

Przy potencjale 7 kV elektroprzędzenie 66,7% roztworu gliceryny długość odcinka prostego strugi była praktycznie niezależna od wydatku roztworu, a kąt rozwarcia stożka wykazywał silne oscylacje, co jest typowe dla szerokiego zakresu 100-800 μ l/godzinę.



Rys. 5-12 Zależność a/ długości prostego odcinka i b/ kąta rozwarcia stożka od wydatku w procesie elektroprzędzenia 52,7% roztworu gliceryny dla zakresu wydatków 100-800 μ l/godzinę, zastosowany potencjał 7kV.

Jak widać na rysunkach 5-12, dla 52,7% roztworu gliceryny – podobnie jak przy wyżej omawianym stężeniu (Rys. 5-11) – długość odcinka prostego była praktycznie niezależna od wydatku roztworu. W tym jednak przypadku kąt rozwarcia stożka wykazywał silniejsze oscylacje (silnie rosnące ze wzrostem wydatku).

Ocenia się, że dla badanych parametrów dobrany wydatek nie ma większego wpływu na wyniki dla roztworów o większym stężeniu gliceryny, zaś dla roztworów o mniejszym stężeniu proces elektroprzędzenia zachowuje się stabilnie przy niższych wydatkach. Przy wydatku rzędu 800 μ l/godzinę proces zaczyna mocno oscylować, co powoduje powstanie dużych błędów, zwłaszcza, jeśli chodzi o wartość kąta rozwarcia stożka.

6 Model numeryczny procesu tworzenia się nanowłókien w polu elektrycznym

Powstawanie włókien, niezależnie od stosowanych materiałów i technologii, opiera się na podstawowym zjawisku mechaniki płynów, tworzeniu się strugi cieczy. Ciecz wypływając z otworu do drugiego niemieszającego się płynu (gazu lub cieczy) tworzy mniej lub bardziej regularną strukturę cylindryczną. Jej początkowa średnica zależy bezpośrednio od wielkości otworu wypływowego. Powierzchnia tak powstałej strugi zostaje utworzona w wyniku napięcia powierzchniowego (czy międzyfazowego) stabilizującego granicę faz. Z drugiej strony cylindryczny kształt jest dynamicznie niestabilny i w wyniku tworzących się fal powierzchniowych ulega rozpadowi na krople. W zakresie małych prędkości przepływu jest to proces zależny liniowo od dynamiki przyprływu i daje się opisać stosunkowo prostą zależnością bezwymiarowej amplitudy osiowo-symetrycznych zaburzeń powierzchni propagujących się wzdłuż kierunku przepływu [87, 110, 53]. W rezultacie zależnie od własności fizycznych płynów i prędkości wypływu cieczy możliwe jest uzyskanie stosunkowo długich i cienkich laminarnych strug cieczy [54]. W praktyce maksymalna długość swobodnej strugi nie przekracza jednak kilku tysięcy jej średnic początkowych. Dopiero dodatkowe efekty stabilizujące powierzchnię, jak własności lepkoplastyczne cieczy, krzepnięcie, czy krystalizacja materiału i dodatkowe mechaniczne rozciąganie tworzącej się strugi, pozwalają na osiągnięcie strug o znacznej długości.

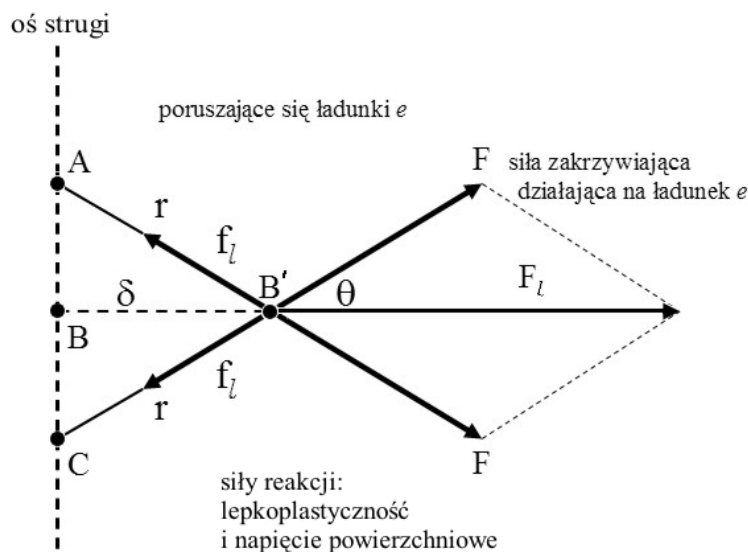
Zmniejszanie rozmiarów włókien (poniżej $1\mu\text{m}$) stwarza szereg nowych problemów technicznych. Ze względu na efekty lepkościowe i kapilarne początkowa średnica strugi nie może być zbyt mała, praktycznie musi mieć wymiar ułamków milimetra. Z kolei proces mechanicznego rozciągania strugi, połączony na ogół z jej utwardzaniem i tworzeniem się włókna, ma swoje ograniczenia. Wraz ze spadkiem średnicy włókna wzrasta długość rozciąganego odcinka i krytyczny staje się problem tłumienia niestabilności powodujących zmiany kierunku i zrywania włókien. Dodatkowym problemem stają się też efekty aerodynamiczne. Stosunek siły oporu opływu do sił spójności rośnie wraz ze spadkiem średnicy opływającego cylindra.

Jednym z możliwych rozwiązań jest zastąpienie rozciągania mechanicznego, polem elektrostatycznym. Okazuje się, że pozwala to na uzyskanie strug o końcowych wymiarach znacznie mniejszych niż jeden mikrometr. Zapoczątkowane w ubiegłym stuleciu badania nad wykorzystaniem pola elektrycznego do sterowania procesem rozpadu strug cieczy, kontynuowane później przez G.I Taylora [99], doprowadziły w ostatnich latach do stworzenia stosowanej w tej pracy elektrostatycznej metody produkcji nano-włókien.

Mechanizm oddziaływania sił elektrostatycznych na krople i strugi wiąże się z indukowaniem ładunków elektrycznych w przewodnikach i dielektrykach. W przypadku badanych przez Taylora [99] kropeł powstających na wylocie dyszy mieszczony w polu elektrycznym siły elektrostatyczne i siły napięcia powierzchniowego prowadzą do powstania nowej powierzchni równowagi. Efekt odpychania elektrostatycznego zależy od indukowanej różnicy potencjału a ta rośnie liniowo z wielkością obiektu. W przypadku kropeł prowadzi to

do ich znacznego wydłużenia i w końcu do ich rozpadu. Ze spadkiem średnicy kropli maleje różnica potencjału pola, a jednocześnie rośnie wpływ napięcia powierzchniowego. W rezultacie pole elektryczne prowadzi do rozpadu dużych kropli i tworzy się nowy stan równowagi prowadzi do powstania dyspersji o mniejszych wymiarach.

Zachowanie się strugi cieczy w polu elektrostatycznym podlega podobnym mechanizmom, tzn. oddziaływanie odpychających się ładunków elektrycznych indukowanych w strudze wzdłuż linii pola. Jednak kinetyka ruchu cieczy pozwala na zachowanie stabilności kształtu cylindrycznego, powodując jedynie na znaczną redukcję jej średnicy w miarę oddalania się od wylotu. Jeśli kierunek pola elektrycznego jest równoległy do poruszającej się wzdłuż linii prostej strugi, jego oddziaływanie prowadzi jedynie do dodatkowego przyspieszenia przepływu cieczy. Tor cylindrycznej strugi poruszającej się początkowo ruchem prostoliniowym w polu elektrycznym jest w równowadze chwilowej. Ta chwiejna równowaga ulega w czasie ruchu zaburzeniom, zarówno kierunku ruchu jak i deformacji kształtu strugi. Typowym zaburzeniem kierunku jest tzw. „buckling”, czyli zwijanie się strugi w spiralnym ruchu, znanym dla grawitacyjnie wypływającej strugi, jeśli szybkość odbioru cieczy jest mniejsza niż wydatek z dyszy zasilającej. Obecności pola grawitacyjnego i lepkości cieczy stabilizują ten ruch, co prowadzi do akumulacji cieczy w końcowym odcinku strugi. Dla strug o wymiarach poniżej $1\ \mu\text{m}$ efekty grawitacyjne są zaniedbywalne. Natomiast obecność pola elektrycznego powoduje powstanie dodatkowych sił odpychających w zdeformowanym odcinku strugi, destabilizując strugę i w efekcie wzmacniając amplitudę początkowego zaburzenia.



Rys. 6-1. Siły oddziaływujące na ładunki elektryczne unoszone przez strugę cieczy poruszającą się w polu elektrycznym. Małe zaburzenie prostoliniowego toru strugi powoduje powstanie siły reakcji napięcia powierzchniowego i pola elektrycznego prowadząc do dalszej destabilizacji i w efekcie wymuszając ruch ładunków po orbitach kołowych.

Narastająca deformacja początkowo prostoliniowego toru cylindrycznej strugi powoduje reakcję sił napięcia powierzchniowego (oraz ewentualnie sił lepkoplastycznych dla polimerów), starającą się zmniejszyć krzywiznę toru i sprowadzić strugę do linii prostej. Działanie sił odpychania elektrostatycznego, reakcji i jednoczesnego przyspieszania wzdłuż osi ruchu prowadzi do powstania toru spiralnego, o promieniu spirali zależnym od równowagi wyżej wymienionych sił.

Taka uproszczona interpretacja pozwala tylko na jakościowy opis zjawiska [30, 36, 40, 44, 55, 56]. Dokładniejszy opis wymaga uwzględnienia zjawisk lepkich, efektów reologicznych, oporu aerodynamicznego, dyfuzji ładunków elektrycznych i wpływu indukowanego ruchem ładunków pola magnetycznego. Nie jest to zadanie łatwe i dotychczas brak pełnego modelu analitycznego czy numerycznego oddziaływania strugi cieczy lepkiej z polem elektrycznym (por. Rys. 6-1).

Pierwszym etapem w konstrukcji opisu procesu elektroprzędzenia jest zidentyfikowanie mechanizmów fizycznych odpowiedzialnych za powstawanie wirowego ruchu strugi w polu elektrycznym i zbadanie wpływu parametrów materiałowych oraz warunków fizycznych na stabilność procesu i geometrię tworzącego się stożka obwiedni wirującej w polu elektrycznym strugi. Podstawowe równania opisujące ruch strugi to bilans naprężeń:

$$\frac{d\sigma}{dt} = G \frac{dl}{\ell dt} - \frac{G}{\mu} \sigma$$

gdzie: μ – lepkość cieczy, G – moduł elastyczności, σ – tensor naprężeń, dl/dt – wydłużenie włókna;

bilans pędu:

$$m \frac{dv}{dt} = -\frac{e^2}{\ell^2} - \frac{eV_0}{h} + \pi a^2 \sigma.$$

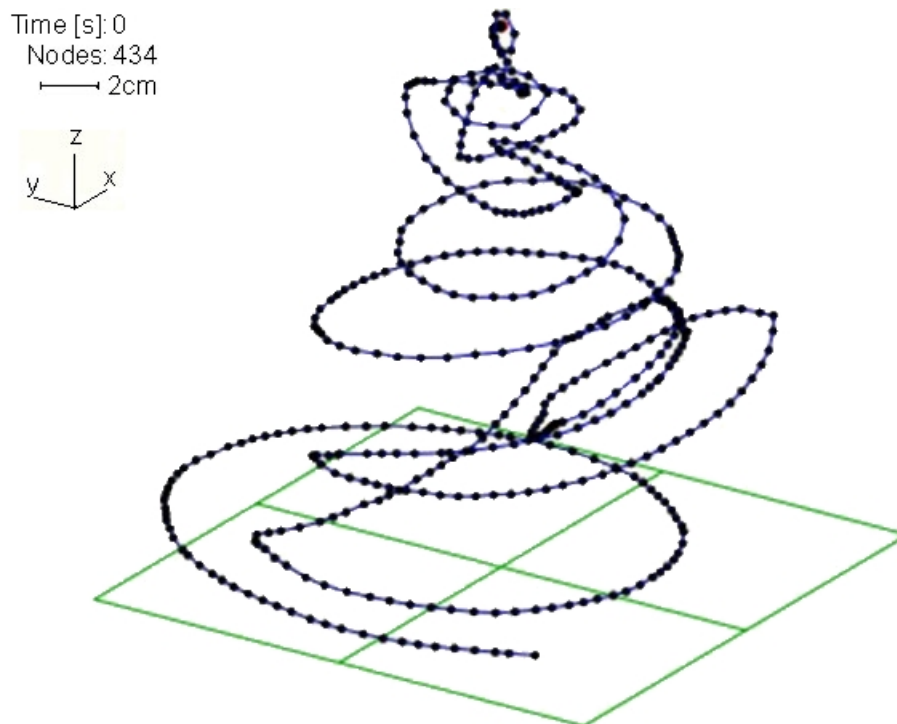
gdzie: V_0 – napięcie elektryczne, e – ładunek elektryczny, a – średnica włókna, h – odległość pipety od kolektora;

oraz równanie ruchu końca strugi, definiujące jego prędkość liniową v :

$$\frac{dl}{dt} = -v.$$

Rozwiązanie układu powyższych równań wymagało dyskretyzacji przestrzennej i czasowej problemu, wprowadzenia dyskretnego opisu ładunków strugi w postaci ciągu jednostkowo naładowanych „koralików”, zastosowania szybkich algorytmów pozwalających na akceptowalny rząd skalowania problemu w funkcji liczby ładunków oraz rozwiązanie problemu deformacji jednorodnego pola elektrycznego przez obecność w nim ładunków strugi. Zbudowany na tej podstawie w ramach realizowanego projektu model numerycznym pozwolił na opisanie podstawowych mechanizmów prowadzących do powstawania niestabilności strugi cieczy w polu elektrycznym (Rys. 6-2). W ramach tej pracy skonstruowano kilka algorytmów całkowania ruchu ładunków w takim polu (menu modelu numerycznego pozwala na wybór 4 algorytmów), przeprowadzono parametryczną analizę wpływu parametrów procesu na geometrię strugi oraz przeprowadzono porównania z rezultatami badań eksperymentalnych. Istotnymi badanymi parametrami była wielkość potencjału pola elektrycznego, przewodnictwo elektryczne cieczy, lepkość cieczy, strumień przepływu cieczy i rodzaj polimeru. Rezultaty badań przedstawione są w powstałych w ramach projektu pracach [55, 56] (w załączniku). Wskazują one na istnienie jedynie bardzo ogólnych trendów zmian geometrii strugi w funkcji tych parametrów. Uniemożliwia to pełne, ilościowe porównanie modelu numerycznego z danymi empirycznymi. Jedną z prawdopodobnych przyczyn, obok małej powtarzalności badań eksperymentalnych, jest brak w opisie teoretycznym istotnych dla pełnego opisu procesu zjawisk reologicznych i

przemiany fazowej (parowanie rozpuszczalnika, krystalizacja składnika stałego). Brak jest również modelu fizycznego opisującego istnienie efektów sprzężonych takich jak wpływ koncentracji składników, soli itp. na lepkość, napięcie powierzchniowe czy przewodność elektryczna płynu na chwilowe parametry fizyczne strugi.



Rys. 6-2 Symulacja numeryczna tworzenia się wirującej strugi cieczy w polu elektrycznym, model zawiera 434 ładunki jednostkowe.

7 Własności mechaniczne nanowłókien

Planowym zadaniem przy realizacji projektu była ocena właściwości mechanicznych nanowłókien i zbudowanych z nich mat, tworzonych metodą elektroprzędzenia. We wszystkich przeprowadzonych testach wytrzymałościowych użytym materiałem były pojedyncze nanowłókna i włókna tworzące siatki, maty, utworzone z roztworu o składzie: 4g PLLA rozpuszczonego w mieszaninie 25g CHCl_3 i 2,5g DMF. Przy produkcji mat zastosowano technikę przędzenia włókien na powierzchni wody, natomiast pojedyncze włókna zbierano na target złożony z dwóch równoległych prętów. Stosowano napięcie 8 kV, wydatek masowy podawania roztworu 0,6ml/h, odległość dysza/target 15cm. Czas przędzenia mat wynosił około 45 minut.

W ramach analizy cech wytrzymałościowych najpierw przeprowadzono obserwacje mikroskopowe włókien polimerowych, a następnie, z uwagi na niestandardowy materiał, wykonano różne testy mechaniczne, by w ten sposób porównać i zweryfikować poprawność wielu uzyskanych wyników.

7.1 Ocena mikroskopowa włókien polimerowych

Ocena mikrostruktury mat i pojedynczych włókien z PLLA jest istotna dla wyjaśnienia przebiegu deformacji włókien w czasie procesów mechanicznych. Modelowanie na poziomie makroskopowym, o największym potencjalnie znaczeniu praktycznym, musi być poprzedzone obserwacją i analizą cech mechanicznych na poziomie mikroskopowym. Omówiona poniżej struktura materiału pokazuje, że nawet na tym poziomie można spodziewać się jedynie uproszczonego analitycznego opisu wiążącego deformację i obciążenie pojedynczego włókna. Przy modelowaniu zdecydowanie bardziej złożonego procesu deformacji maty wydaje się, że ewentualne obliczenia będą możliwe tylko przy zastosowaniu obliczeń numerycznych. Zarówno przy podejściu analitycznym, jak i numerycznym, podstawą jest konstytutywny opis materiału, a jego opracowanie wymaga zrozumienia zachodzących zjawisk wynikających ze struktury wewnętrznej.

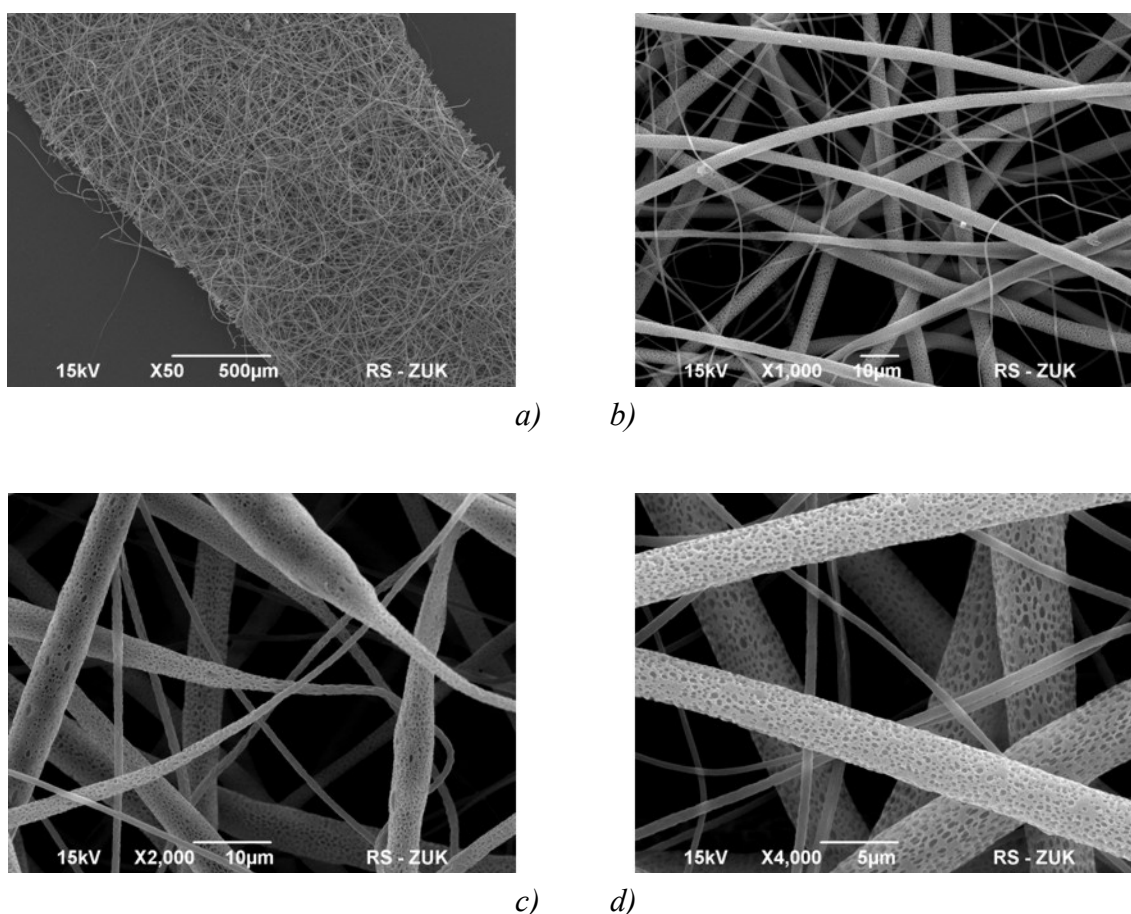
Dla określenia struktury mat poniżej na rysunku 7-1 pokazano przykładowe zdjęcia wykonane przy pomocy SEM S-2600N HITACHI oraz SEM S-5500N HITACHI. Przy użyciu programu QCapture Pro i zdjęć z SEM zmierzone zostały grubości włókien. Poniżej przedstawionych jest kilka istotnych uwag, które mogą mieć znaczenie przy opracowywaniu.

Pierwszą istotną cechą, którą daje się zaobserwować na zdjęciach, jest chaotyczne ułożenie włókien w utworzonej macie. Całkowity brak uporządkowania powoduje, że włókna są odcinkami pozwijane lub wyprostowane, nie da się wyróżnić żadnego uprzywilejowanego kierunku. Ma to istotne znaczenie dla modelowania procesu deformacji maty, bowiem można przyjąć założenie, że mata jest siatkowym materiałem anizotropowym. W materiale poddanym obciążeniu, podczas gdy włókna ulegają istotnym reorientacjom ułożenia, tylko część z nich

jest obciążona wzdłuż swych osi. Taki obraz procesu potwierdzony został w opisanych dalej testach wytrzymałościowych przez obserwacje dużych deformacji materiału. Duże deformacje są wynikiem nie tylko reorientacji włókien w siatkowej strukturze materiału.

Z przeprowadzonych testów wytrzymałościowych z pojedynczymi włóknami wynika wniosek, że samoistną cechą PLLA jest zdolność do dużych deformacji pod obciążeniem działającym wzdłuż osi. Bez wątpienia naprężenia wzdłużne we włóknach nie są jednorodne, bowiem istotną przy tym cechą włókien są charakterystyczne znaczne zmiany grubości. Zmiany te wydają się nie mieć żadnej regularności. Można także zauważyć istotne różnice grubości pomiędzy porównywanymi włóknami. Przeprowadzone pomiary wykazują, że grubości zmieniają się od $0,3\mu\text{m}$ do $5\mu\text{m}$, a dla pogrubionych miejsc nawet do $11\mu\text{m}$. Ważne jest również, że ze względu na sposób otrzymywania mat ich grubość jest niejednorodna.

Ostatnią cechą o dużym znaczeniu dla wytrzymałości włókien i mat z PLLA jest porowatość włókien. Pory są widoczne na zdjęciach SEM przy powiększeniu powyżej $1000\times$. Obecność porowatej struktury stwierdzono w większości włókien w badanej próbce. Układ porów, w większości o kolistym kształcie, w niektórych przypadkach znacznie wydłużonych, nie ma żadnej regularności. Na podstawie fotografii oszacowano długości porów uzyskując wyniki od $0,3\mu\text{m}$ do $2\mu\text{m}$ przy średnicach włókien wahających się od $0,9\mu\text{m}$ do $3\mu\text{m}$.



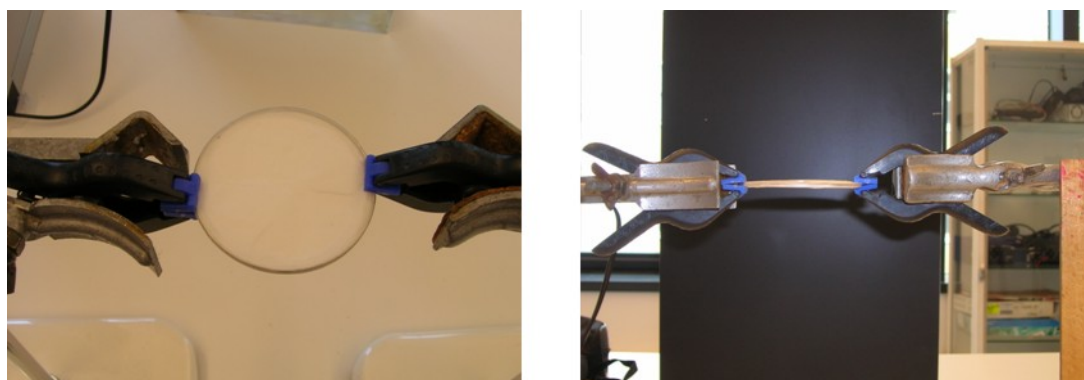
Rys. 7-1 Obserwacja struktury mechanicznej mat PLLA, powiększenia: a) $50\times$, b) $1000\times$, c) $2000\times$, d) $4000\times$.

7.2 Ocena wytrzymałości mat polimerowych

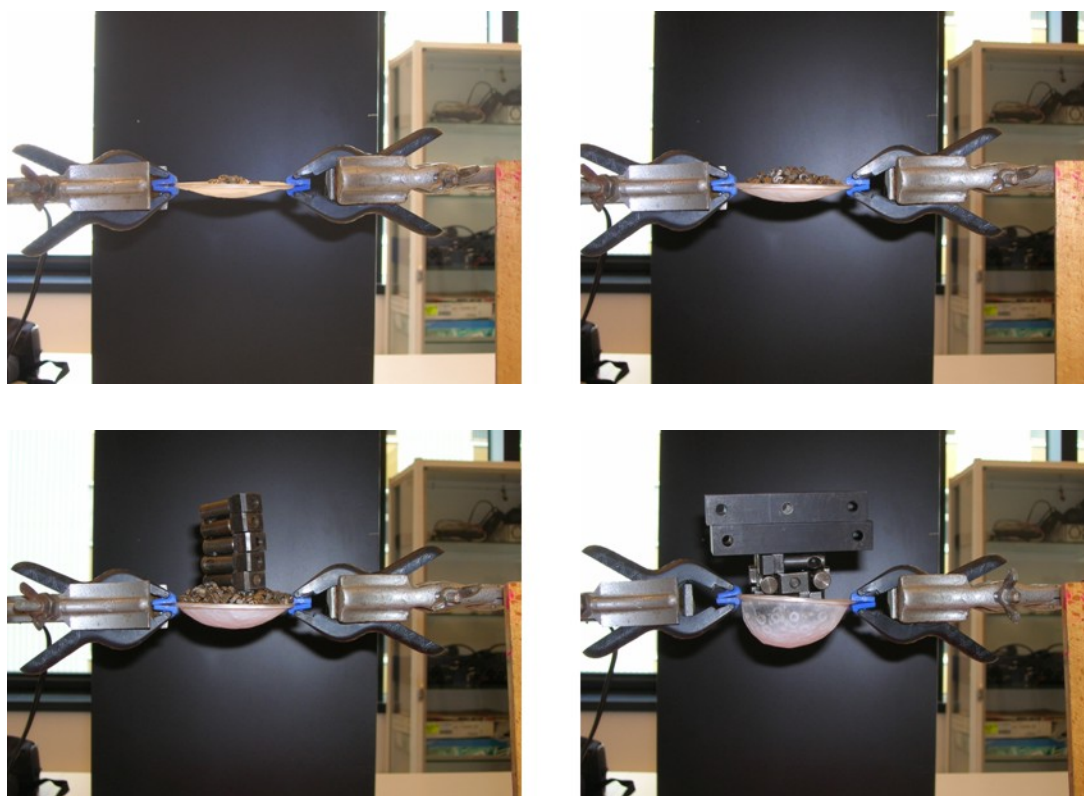
Ocenę wytrzymałości mat wykonano na podstawie trzech rodzajów testów. Pierwszym było proste obciążanie maty elementami metalowymi, w drugim deformację maty wywoływał strumień gorącego powietrza, w ostatnim użyto maszyny wytrzymałościowej.

7.2.1 Badania ugięcia mat polimerowych pod ciężarem

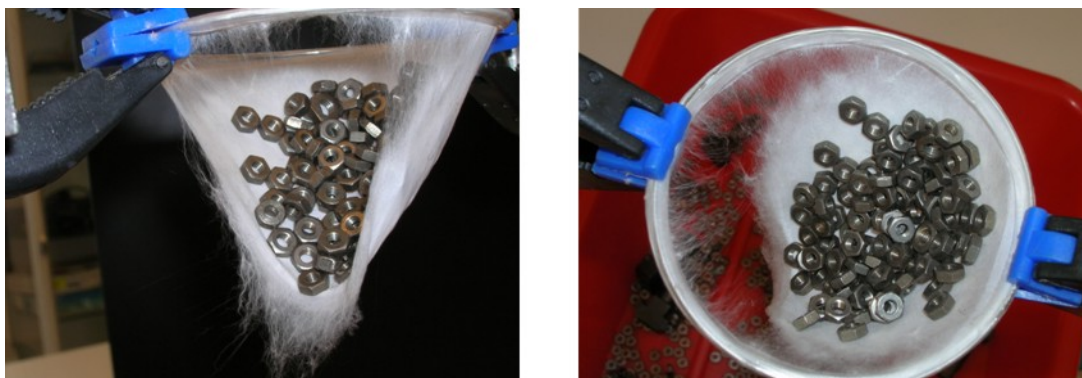
Wstępne testy wytrzymałości mat z elektroprzędzonych włókien z PLLA przeprowadzono umieszczając badany materiał między dwiema metalowymi obręczami, trzymanymi w dwóch miejscach przy pomocy uchwytów. Ze względów „technologicznych”, o czym była mowa wcześniej, użyta siatka była grubsza na środku i cieńsza na brzegach.



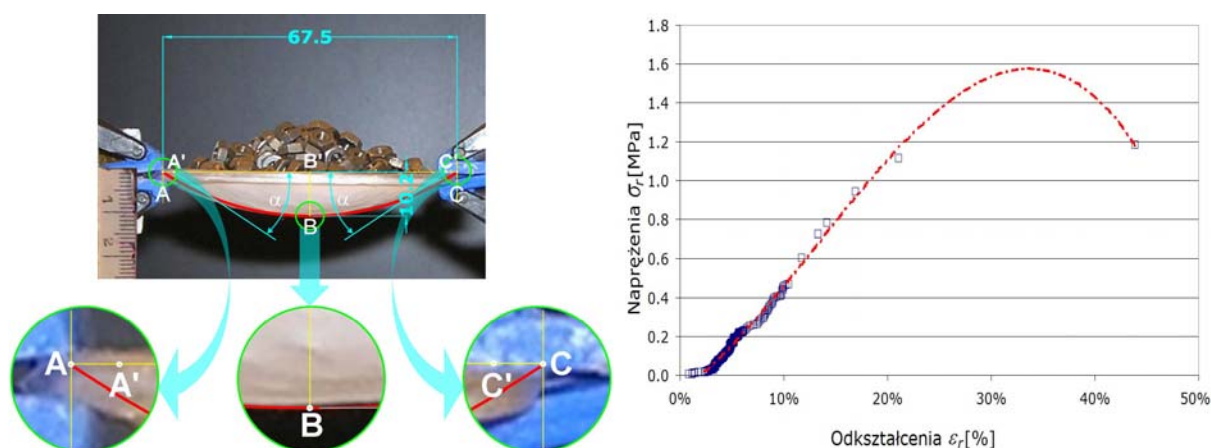
Rys. 7-2 Prosty test wytrzymałości maty – zamocowanie testowanego materiału.



Rys. 7-3 Przykładowe zdjęcia pokazujące sposób przykładania obciążenia i deformację maty w prostym teście wytrzymałościowym.



Rys. 7-4 Widok maty po zakończeniu prostego testu wytrzymałościowego.



Rys. 7-5 Wyznaczanie odkształceń i krzywa σ_r - ε_r otrzymana w prostym teście wytrzymałościowym.

Przebieg testu pokazują zdjęcia poniżej. W pierwszej fazie obserwowano narastające ugięcie siatki pod ciężarem kolejno dokładanych niewielkich obciążników. Siatka całkowicie została wypełniona obciążnikami (o średniej masie 0,3 g) bez problemu utrzymała ciężar zwiększony do około 160 g. Dalsze kontynuowanie eksperymentu, aż do przerwania maty i tym samym jej zniszczenia, wymagało obciążania większymi elementami. Zerwanie siatki nastąpiło dopiero przy łącznej masie obciążników wynoszącej 590 g.

Wykres σ_r - ε_r przedstawiony wyżej ilustruje charakterystykę mechaniczną nanowłókn uzyskaną w uproszczony sposób na podstawie eksperymentu z matą, zawieszoną na drucie/„ruszcie” i obciążaną ciężarem w postaci układanych metalowych elementów. Przebieg eksperymentu i założenia niezbędne do obliczeń wyjaśnia przykładowe zdjęcie z naniesionymi dodatkowo oznaczeniami. W obliczeniach przyjęto, że ugięcia maty, widoczne na kolejno wykonanych zdjęciach, można w rzutach przybliżyć łukiem okręgu przechodzącego przez punkty A', B i C'. Punkty A' i C' leżą po wewnętrznej stronie koła wyznaczonego przez drut/„ruszt”, natomiast punkt B jest najniższym położonym punktem środkowym maty. Ze względu na jakość zdjęć (widoczność końców drutu/„rusztu”) najpierw wyznaczany był łuk ABC (linia czerwona naniesiona na zdjęciu. Pary punktów A i A' oraz C i C' rozdziela odległość 2,25mm równa średnicy drutu/„rusztu”). Przy tych założeniach ze zdjęć mierzona była jedynie odległość między punktami B i B'.

Odształcenia ε_r wyliczone zostały wg wzoru: $\varepsilon_r = (l - l_0) / l_0$, gdzie l_0 oznacza odległość punktów A' i C' ($l_0 = 63\text{mm}$), a l jest szacowaną długością łuku okręgu A'BC'. Naprężenia σ_r wyliczone zostały wg wzoru $\sigma_r = P / \pi l_0 g \sin(\alpha)$, gdzie g oznacza grubość maty zmierzoną śrubą mikrometryczną ($g = 25\mu\text{m}$), α jest kątem nachylenia w punkcie A' (lub C') stycznej do łuku A'BC'.

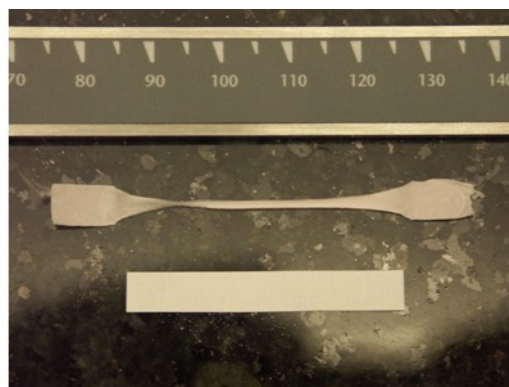
Największe zarejestrowane przed zerwaniem maty obciążenie wynosiło 5,7879N, a odpowiadające mu ugięcie (odległość BB') 27,2mm. Zgodnie z wyżej opisanym szacunkiem odpowiada to naprężeniu $\sigma_r=1,18\text{MPa}$ i ugięciu $\varepsilon_r=43,86\%$. Warto zauważyć, że uszkodzenie struktury nastąpiło nie w centrum struktury siatki, ale na krawędzi, w miejscu bezpośrednio kontaktującym się z metalową obręczą, w okolicy uchwytu.

7.2.2 Mata testowana na maszynie wytrzymałościowej

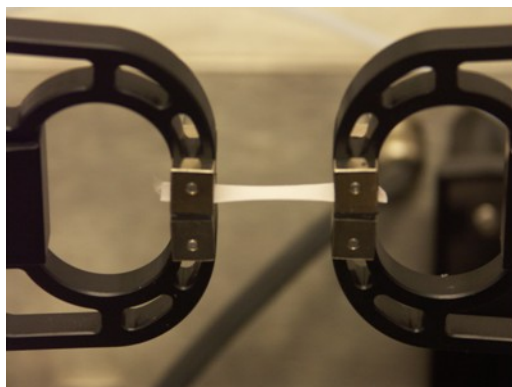
Kolejne badanie wytrzymałości mat wykonano na maszynie wytrzymałościowej MTS Tytron 250 (patrz Rys. 7-7). Wycięto 5 próbek o wymiarach 6x40mm. Grubość maty oszacowano ze zdjęć SEM, wynosiła około 52 μm . Próbki umieszczane były kolejno w uchwytach maszyny wytrzymałościowej, rozciągane ze stałą prędkością 4mm/min.



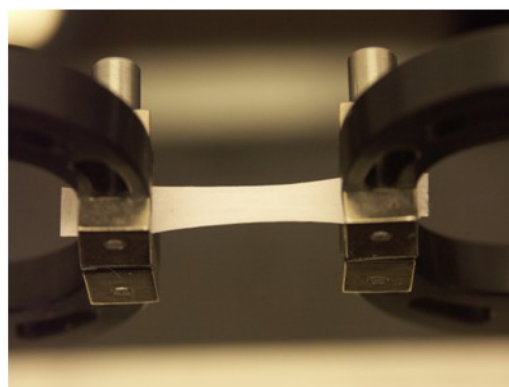
Rys. 7-7 Maszyna wytrzymałościowa MTS Tytron 250.



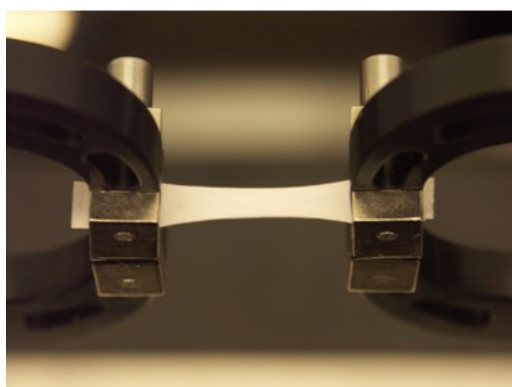
Rys. 7-8 Próbkę przed i po rozciągnięciu.



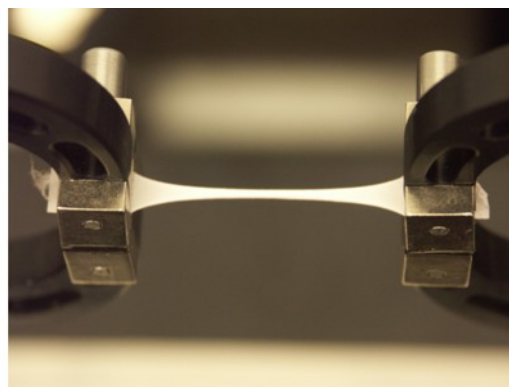
a)



b)



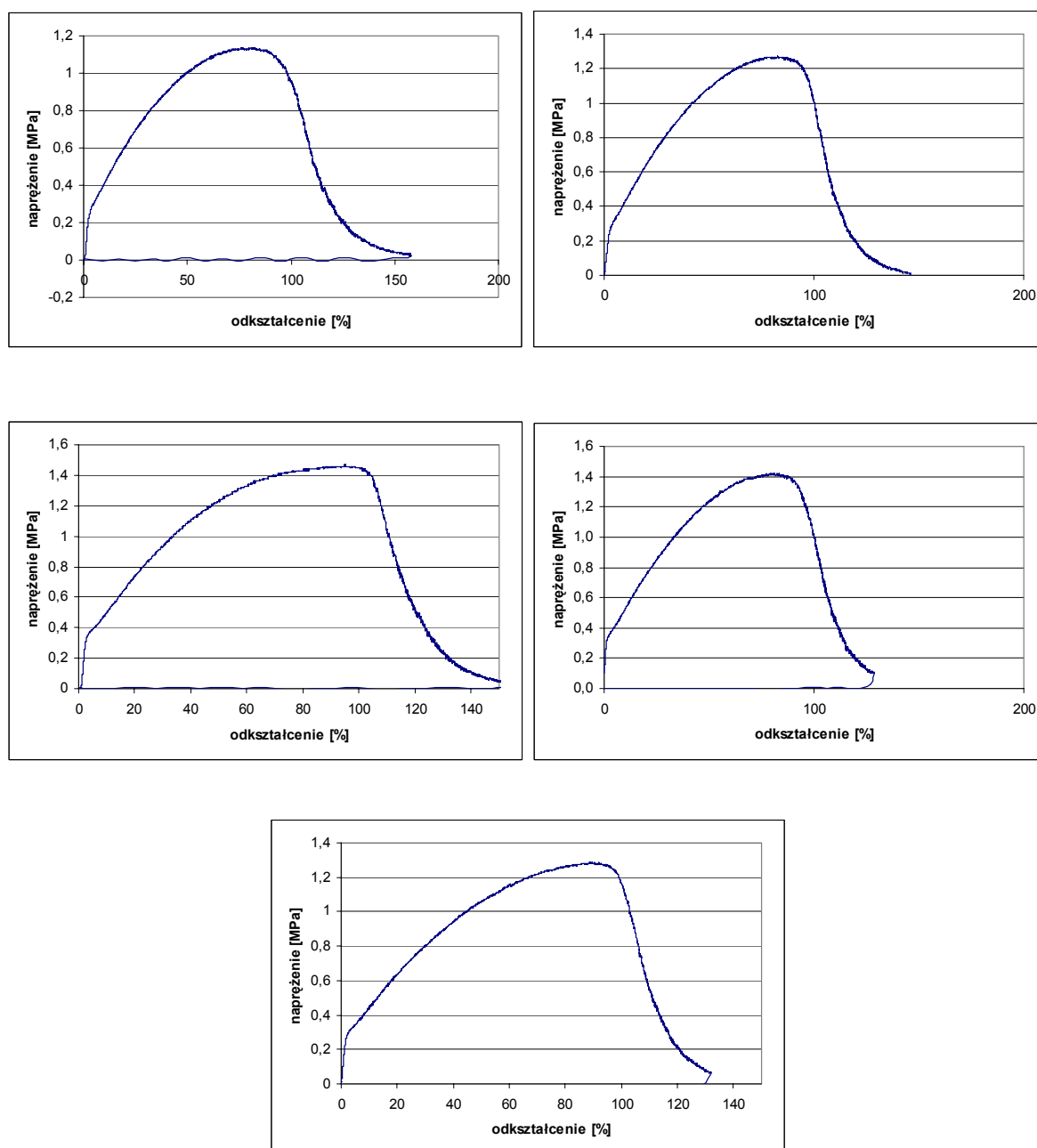
c)



d)

Rys. 7-9 Zdjęcia kolejnych etapów rozciągania a-d.

Na zdjęciach, opisanych jako rysunki 7-8 i 7-9, pokazane są próbki przed i po rozciąganiu oraz w trakcie przeprowadzania próby wytrzymałościowej. Przyjmuje się, że czujniki użyte powinny być stosowane dla sił nie mniejszych niż 1% ich wartości, czyli w przypadku użytego 5N czujnika 0,05N. Siły mierzone dla pojedynczych włókien nie spełniały tego ograniczenia (maksymalne siły rejestrowane to 0,006N). Na podstawie zarejestrowanych wyników wykreślono zależności naprężenia w funkcji odkształcenia oraz wyznaczono Moduły Younga. Wyniki badań zestawiono w tabelach od 7-1 do 7-3.



Rys. 7-10 Zależności σ - ϵ otrzymane z kolejnych prób wytrzymałościowych mat z PLLA.

Tabela 7-1 Wyniki wytrzymałości i modułu Younga mat.

	Naprężenie max [MPa]	Moduł Younga [MPa]
1	1,14	18,4
2	1,47	21,5
3	1,27	18,0
4	1,42	21,1
5	1,28	17,9
śr.	1,32	19,4

Tabela 7-2 Wyniki wytrzymałości i modułu Younga włókien z mat, po uwzględnieniu rzeczywistego przekroju włókien.

	Naprężenie max [MPa]	Moduł Younga [MPa]
1	9,4	152
2	10,5	148
3	12,1	161
4	12,1	174
5	11,7	147
śr.	10,6	156

7.2.3 Porównanie wyników wytrzymałości mat

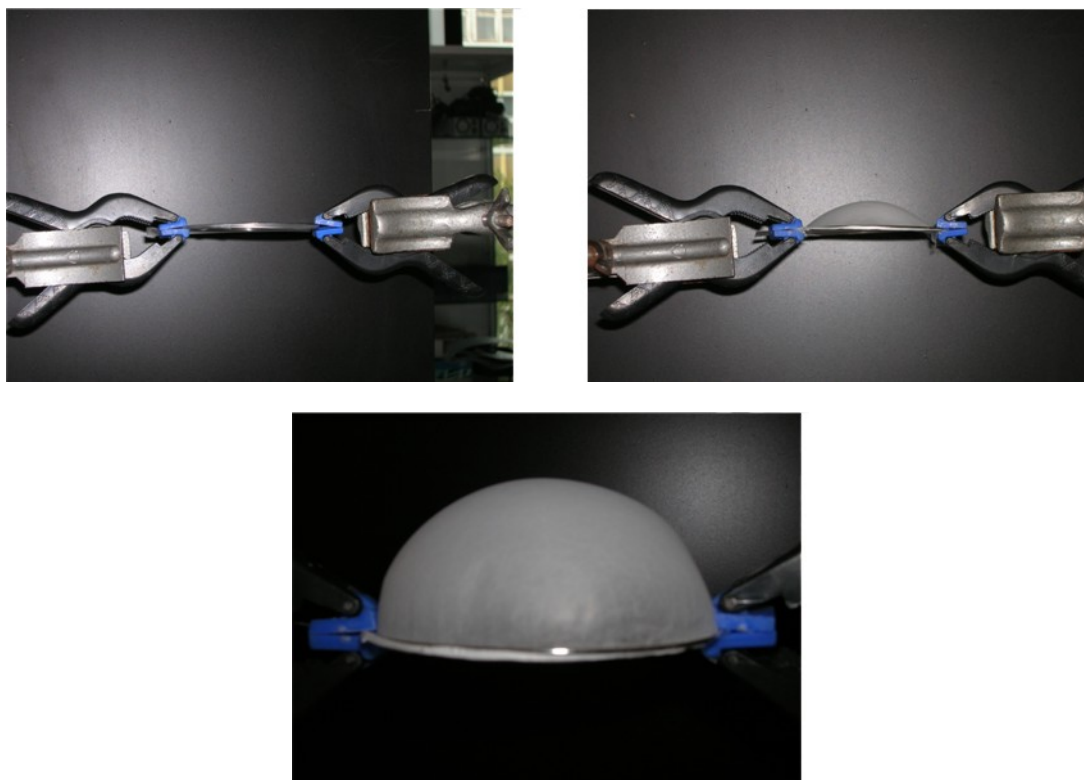
Prosty test i próba na maszynie wytrzymałościowej pozwoliły wyznaczyć zbliżone wartości maksymalnych naprężeń. Wartości otrzymane z testów przeprowadzonych na maszynie wytrzymałościowej porównano z wielkościami Modułu Younga i maksymalnego naprężenia oraz odkształcenia znanych elastycznych materiałów biologicznych. I tak maksymalne naprężenie było o około połowę mniejsze niż rusztowań z DNA i znacznie mniejsze niż dla skóry i chrząstki stawowej, wartość odkształcenia obejmowała górne wartości badanych materiałów. Moduł Younga siatki z włókien miał wartość porównywalną z dolną wartością dla skóry i około połowy wartości dla rusztowań z DNA.

Należy zwrócić uwagę na sposób otrzymania uzyskanych wartości. Mata z nanowłókien mierzona była po zewnętrznej obwiedni i traktowana jako lity materiał o grubości 52 μm . Ze wszystkich zdjęć SEM wynika luźna włóknista struktura otrzymanego silnie porowatego materiału. Materiał zmierzony po zewnętrznej obwiedni zawierał głównie powietrze, a za wytrzymałość mechaniczną odpowiadała stosunkowo niewielka ilość włókien materiału. Dla zagęszczenia materiału przy zachowaniu włóknistej struktury użyto rozdmuchu gorącym powietrzem opisanego dalej.

7.3 Odporność na zrywanie strumieniem gorącego powietrza

Przeprowadzono eksperyment badania odporności siatki z elektroprzędzonych włókien PLLA na zrywanie strumieniem gorącego powietrza. Wykorzystano układ pomiarowy z poprzedniego doświadczenia. Jako źródło strumienia powietrza wykorzystano suszarkę z dwustopniowym systemem podawania powietrza. Prędkość przepływu powietrza mierzono przy pomocy elektronicznego anemometru Testo 425 między anemometrem a siatką, w

odległości 2 cm od poziomu metalowej obręczy. Zmierzone początkowe wartości wyniosły w przed siatką 0,5 m/s oraz 0,15 m/s za siatką. Siatka uległa trwałemu wybrzuszeniu (około 1 cm), widocznemu na poniższych fotografiach i nie powróciła do stanu pierwotnego. Zwiększono prędkość przepływu powietrza do 1 m/s przed siatką, obserwując dalsze odkształcenie (do około 3 cm). Deformacja maty ustabilizowała się na pewnym poziomie i w czasie dalszego testu nie zwiększała się, a anemometr ustawiony za siatką wskazywał zerową prędkość przepływu. Temperatura powietrza wydmuchiwane przez suszarkę osiągała około 60°C dla większej prędkości przepływu. Może to powodować topienie i sklejanie włókien, a co za tym idzie także zmianę struktury i ułożenia włókien. Gorące powietrze spowodowało widoczne, trwałe utwardzenie siatki.



Rys. 7-6 Zdjęcia przedstawiają układ doświadczalny przed testami, po utwardzeniu powietrzem o prędkości 0,5 cm/s oraz o prędkości 1 m/s. Temperatura utwardzania: około 60°C.

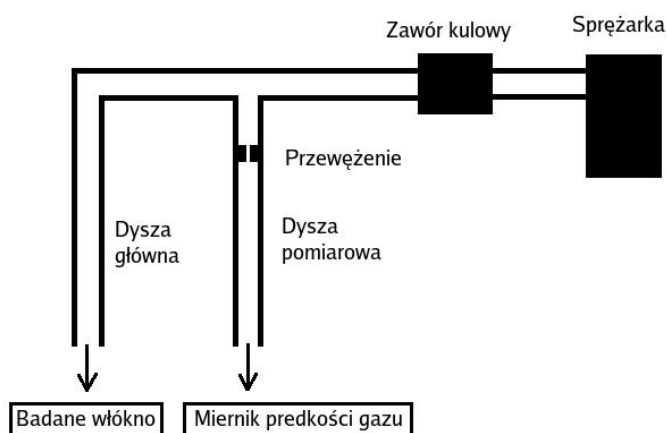
7.3 Wytrzymałość pojedynczych nanowłókien

Dla określenia dokładniejszej charakterystyki mechanicznej przeprowadzono pomiar wytrzymałości na stanowisku eksperymentalnym, gdzie wokół rozpiętego między szczękami pojedynczego nanowłókna przepływał gaz. Testowane włókna starano się doprowadzić do całkowitego zerwania zwiększając jego obciążenie wywierane przez rosnący wydatek gazu.

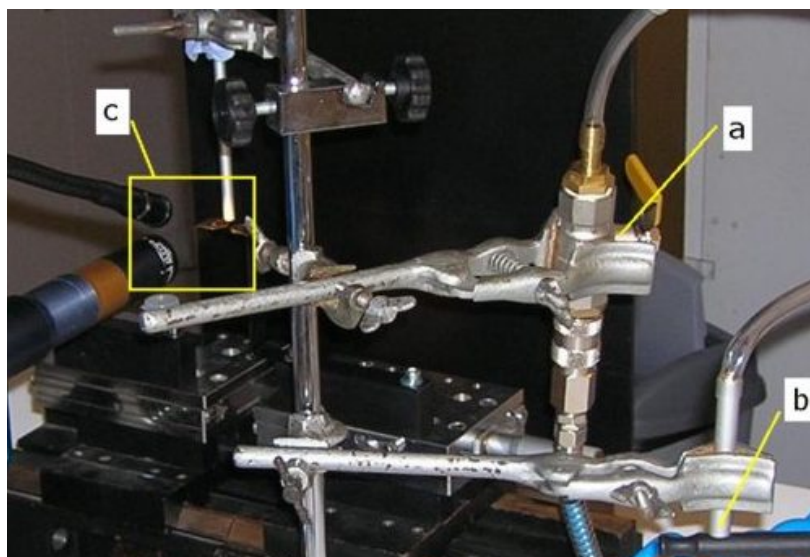
Na schemacie stanowiska, pokazanym na rysunku 7-11, wyróżniono sprężarkę, zawór kulowy, dalej przewód rozdzielający gaz na dwie dysze: główną i pomiarową, i na końcu miernik przepływu oraz badane włókno. Ogólny widok stanowiska pomiarowego oraz jego istotne detale pokazane są na fotografiach zamieszczonych na rysunkach 7-12 i 7-13.

Włókna pobierane były z ramki do otrzymywania włókien równoległych i przeniesione na szczęki przyklejane do ich górnej powierzchni za pomocą roztworu PEOX. Włókna opływane szybkim strumieniem gazu i poddane sile oporu hydrostatycznego wpadały w

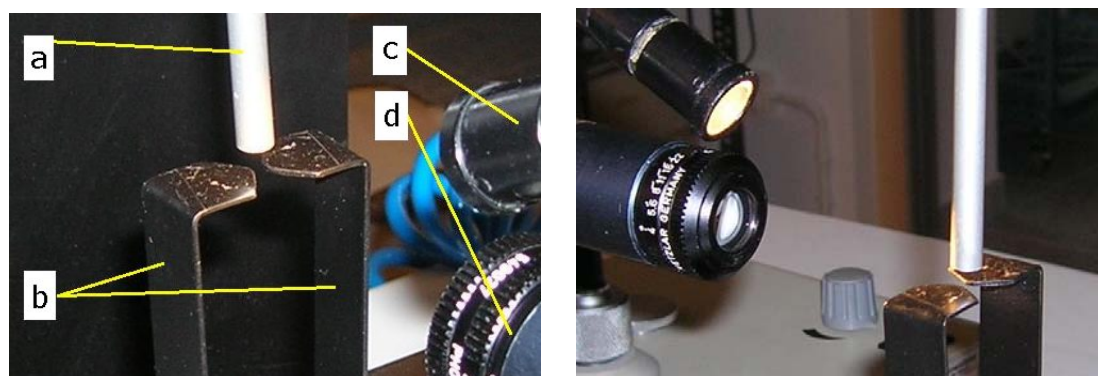
drżania, zatem deformację zamocowanego włókna należało rejestrować szybką kamerą. Każdemu zdjęciu towarzyszył pomiar prędkości gazu w dyszy pomiarowej. Zdjęcia były podstawą dla wyznaczenia zmian długości zdeformowanego włókna, a zarejestrowane prędkości służyły dla wyznaczenia sił obciążających włókno.



Rys. 7-11 Schemat blokowy układu pomiarowego.

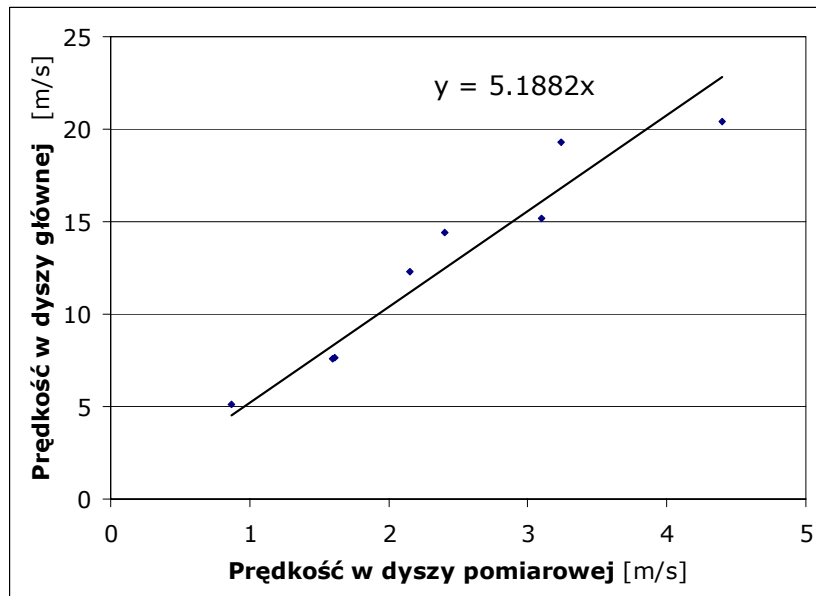


Rys. 7-12 Układ eksperymentalny do zrywania pojedynczych włókien: a) zawór kulowy, b) dysza pomiarowa z prędkościomierzem gazu, c) dysza ze szczękami i obiektywem kamery (patrz Rys. 7-13).



Rys. 7-13 Dwa widoki detalu układu pomiarowego (patrz Rys. 7-12): a) dysza główna, b) szczęki z włóknami na górnej powierzchni, c) źródło światła, d) obiektyw kamery.

Zastosowano dwie dysze: główną, z której wypływał gaz obciążający włókno, oraz pomiarową z prędkościomierzem gazu, w której prędkość była rejestrowana w czasie rzeczywistym, bez zbędnych zakłóceń. W dyszy pomiarowej było przewężenie powodujące proporcjonalnie mniejszy przepływ gazu niż w dyszy głównej. Z tego powodu należało przeprowadzić kalibrację pomiaru – odpowiednie przeliczenie zilustrowane jest na wykresie (Rys. 7-14).



Rys. 7-14 Zależność prędkości gazu w dyszy głównej w funkcji prędkości gazu w dyszy pomiarowej.

Obciążenie włókna wyliczono według wzoru

$$F = \frac{1}{2} C_D \rho v^2 dl$$

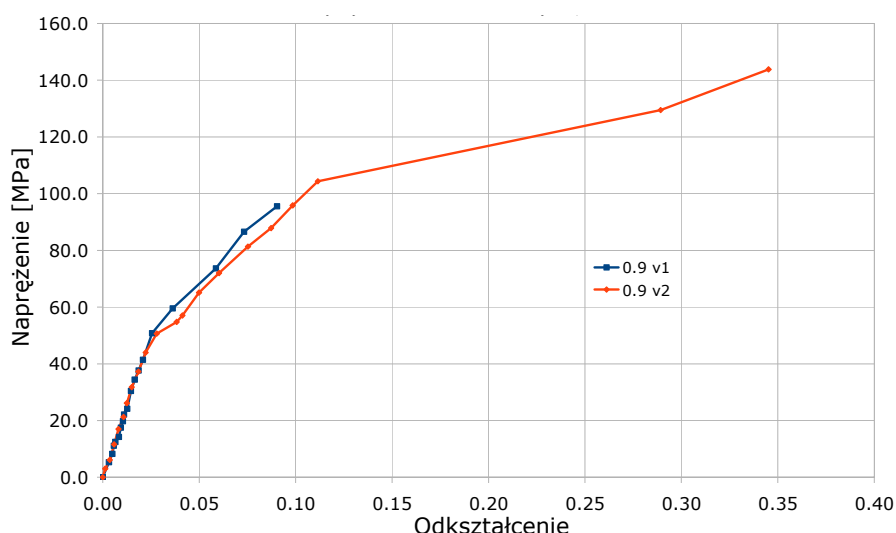
gdzie F oznacza siłę obciążającą włókno, a d i l oznaczają odpowiednio średnicę i długość zdeformowanego włókna, C_D jest współczynnikiem oporu, ρ i v oznaczają odpowiednio gęstość i prędkość gazu. Współczynnik oporu liczony był według wzoru

$$C_D = \frac{8\pi}{\text{Re}(2 - \log_{10} \text{Re})}$$

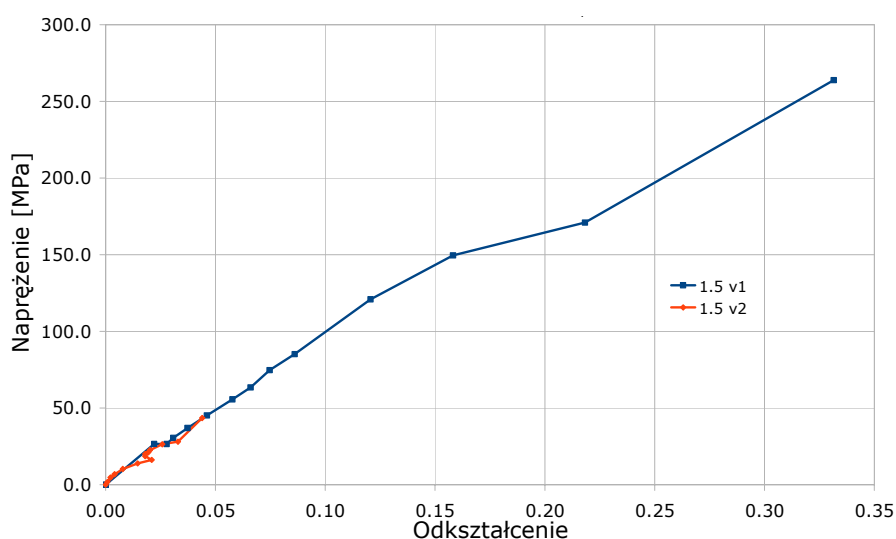
gdzie Re oznacza liczbę Reynoldsa zależną od lepkości μ gazu

$$\text{Re} = \frac{\rho v d}{\mu}$$

Przyjmując, że średnica d z założenia jest wielkością stałą, naprężenia przenoszone przez włókna wyliczone zostały według wzoru $\sigma = 4F/\pi d^2$. Odkształcenia wynikające z wydłużenia włókna określano jako $\varepsilon = \ln(l/l_0)$, gdzie l_0 oznacza początkową długość włókna. Na wykresach 7-15 i 7-16 pokazane są otrzymane zależności pomiędzy naprężeniami σ i odkształceniami ε testowanych włókien.



Rys. 7-15 Wynik testu wytrzymałości pojedynczych włókien o średnicy $0.9\mu\text{m}$.



Rys. 7-16 Wynik testu wytrzymałości pojedynczych włókien o średnicy $1.5\mu\text{m}$.

7.4 Porównanie wyników dla mat i pojedynczych włókien

Z testów wytrzymałościowych przeprowadzonych dla mat w uproszczony sposób wyliczono naprężenia przenoszone przez pojedyncze włókna. Pozwala to na porównanie tych wyników z wynikami dla pojedynczych włókien. Przy wyliczaniu powierzchni włókien w przekroju poprzecznym maty przyjęto następującą procedurę. Wycięto 5 krążków o średnicy 20mm, grubości 0,5mm z mat PLLA. Średnia masa krążków wyniosła 2,09mg. Przyjęto gęstość PLLA $1,1\text{g/cm}^3$ (przy teoretycznej $1,25\text{g/cm}^3$). Wyliczono, że włókna zajmują jedynie 12% objętości krążka. Przeliczono tę wartość na objętość, jaką stanowi włókno w próbce rozciąganej oraz na przekrój rzeczywisty włókna w całkowitym przekroju próbki. Przekrój poprzeczny włókien w próbce poddawanej rozciąganiu to $3,6\mu\text{m}$. W odniesieniu do siły przyjęto tę wartość, a nie na cały przekrój maty, by obliczyć efektywne naprężenie przypadające na włókna w macie (wyniki z tabeli 7-3).

Tabela 7-3 Wyniki wytrzymałości i modułu Younga pojedynczych włókien z rozciąganych pęczków.

	Naprężenie max [MPa]	Moduł Younga [MPa]
1	131	30,1
2	56	18,8
3	83	40,8
4	77	8,6
śr.	87	24,6

Naprężenia maksymalne przenoszone przez pojedyncze włókna z maty są niższe niż naprężenia przenoszone przez matę, ponieważ pomiar nie uwzględniał przekroju rzeczywistego włókna. Wyliczenia dla pojedynczych włókien są generowane przy pewnych założeniach np. równej grubości oraz gęstości maty. Atutem wydaje się fakt, że maty użyte przy rozciąganiu i określeniu ilości włókna w macie pochodziły z tego samego dnia przędzenia.

Wyniki wykonanych obliczeń są zgodne z przewidywaniami, tj. pojedyncze włókno jest zdolne do przenoszenia większego obciążenia niż włókno w macie. Wynika to z faktu, że włókna w macie są ułożone nierównomiernie, w różnych kierunkach – bez możliwości określenia kierunku uprzywilejowanego – zatem tylko część składowa wypadkowej obciążenia działa na pojedyncze włókno. Siły nierównomiernie rozłożone na poszczególne włókna powodują wcześniejsze zniszczenie włókien najbardziej obciążonych.

8 Optymalizacja wydajności procesu elektroprzędzenia

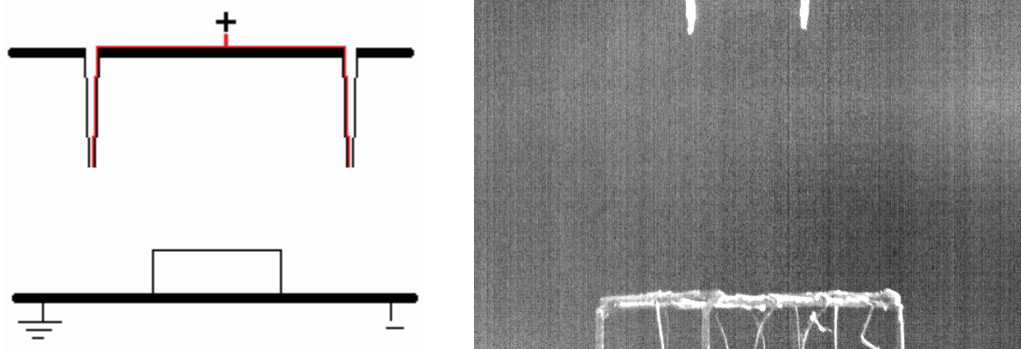
Jednym z ważniejszych problemów związanych z elektroprzędzeniem nanowłókien, podobnie, jak z innymi nanotechnologiami, jest wydajność procesu. Na podstawie rozpoznania literaturowego wiadomo, że dla podwyższenia wydajności procesu stosowane są dwie metodologie: prowadzenie procesu z użyciem jednocześnie wielu dysz, lub układy bezdyszowe. W drugiej metodzie wywołuje się zaburzenia na powierzchni cieczy, z których odrywają się strumienie elektroprzędzonego materiału (wykorzystuje się do tego np. ciecze ferromagnetyczne lub gaz tworzący bańki na powierzchni cieczy).

W niniejszym rozdziale opisano badania, których celem było poszukiwanie możliwości zastosowania znanych z literatury rozwiązań, prowadzących do podwyższenia wydajności procesu elektroprzędzenia, oraz określenie struktury otrzymanego w ten sposób materiału. Do elektroprzędzenia zastosowano 3% roztwór poli(tlenku etylenu), PEO, w 40% roztworze wodno-etanolowym. Badano dwa typy układów: dwudyszowy i bezdyszowy.

8.1 Elektroprzędzenie w układzie dwudyszowym

W pierwszym z eksperymentów wykorzystano różne warianty układów z dwoma dyszami, z których równocześnie tworzone były strumienie elektroprzędzonego materiału. W pierwszym wariantcie wykorzystano dzielnik strumienia materiału dostarczanego z pompy do dwóch dysz. Stwierdzono, że proces elektroprzędzenia nie jest stabilny. Stan równowagi pomiędzy wypływem z dysz był nietrwały, a dysze oddziaływały ze sobą. Elektroprzędzenie z dwóch dysz zasilanych z jednej pompy zawsze kończyło się po kilkudziesięciu sekundach, gdy dochodziło do zatykania wylotu jednej z dysz i druga dysza przejmowała cały pompowany materiał.

Dla rozwiązania problemu spotkanego w pierwszym wariantcie w drugim z układów do elektroprzędzenia wykorzystano dwie niezależnie zasilane dysze, do których roztwór podawany był grawitacyjnie (Rys. 8-1 i 8-2). Dysze umieszczone były w odległościach 50, 75 i 100mm. Idea systemu opiera się na patencie Formhalsa z 1944 roku. Udało się uzyskać w miarę stabilny proces elektroprzędzenia i dzięki temu wykonano pomiary polegające na sprawdzeniu skuteczności procesu dla dwóch odległości pomiędzy dyszami a targetem: 10cm i 15cm.



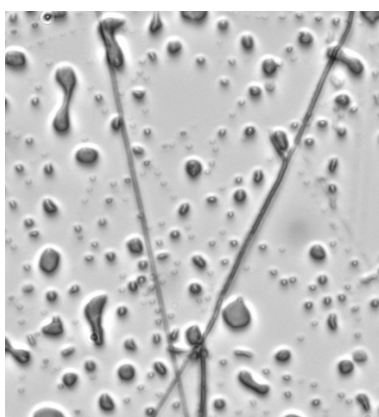
Rys. 8-1 Schemat i zdjęcie układu dwóch dysz stosowanych równocześnie w elektroprzędzeniu.

Tabela 8-1 Kąt tworzony przez proste odcinki podczas elektroprzędzenia w układzie dwóch dysz.

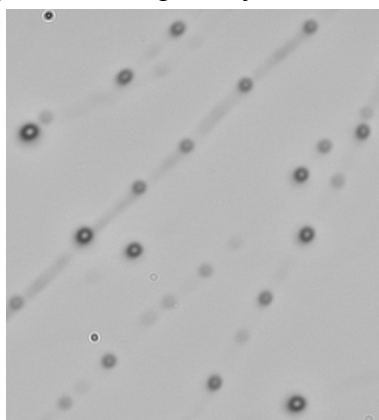
Odległość pomiędzy dyszami	Kąt pomiędzy strumieniami
[mm]	[deg]
50	23
75	20
100	26



Rys. 8-2 Elektroprzędzenie z układu dwóch dysz dla odległości pomiędzy dyszami 10 mm, odległość od targetu 15 cm, potencjał 18 kV.



Rys. 8-3 Nanowłókna otrzymane w układzie dwóch dysz przy odległości pomiędzy dyszami 75 mm, odległość od targetu – 10cm, potencjał 18 kV. Powiększenie 20 razy.



Rys. 8-4 Nanowłókna o strukturze „koralików na sznurku”, otrzymane w układzie dwóch dysz przy odległości pomiędzy dyszami 50 mm, odległość od targetu – 10cm, potencjał 15 kV. Powiększenie 100 razy.

Na schemacie z Rys. 8-1 przedstawiono dwie dysze przyłączone do dodatniego bieguna zasilacza wysokiego napięcia, na dole znajduje się target z siatki miedzianej podłączony do bieguna ujemnego zasilacza i do uziemienia. Proces elektroprzędzenia rejestrowano z zastosowaniem szybkiej kamery w celu późniejszego wyznaczenia kąta pomiędzy prostymi odcinkami materiału elektroprzędzonego z dwóch dysz (Rys. 8-2). Wyniki pomiarów kąta pomiędzy strumieniami przy różnych odległościach zebrano w Tabeli 8-1.

Porównując eksperymenty z trzema układami i analizując kąty między strugami w zależności od odległości dwóch dysz można oceniać, że wobec znacznego błędu pomiaru nie istnieje wyraźna tendencji zmiany.

Przeprowadzono również pomiary, w których obie dysze były podłączone do prądu, ale tylko jedna z nich była zasilana cieczą. W takim układzie obie dysze wpływały na strugę wyciekającą z dysz, przy czym jedna wywoływała elektroprzędzenie, a druga jedynie wpływała na odchylenie strugi od poziomu. Wpływ dyszy bez cieczy był wyraźny – powodował odepchnięcie strumienia i dodatkowe odchylenie prostego odcinka strugi od pionu. Uzyskane rezultaty wskazują, że zachodzi oddziaływanie pomiędzy jednoimiennie naładowanymi dyszami podłączonym do zasilacza wysokiego napięcia. Jest to wynik zgodny z intuicją. W badanym zakresie odległości pomiędzy dyszami stwierdzono, że niezależnie od użytej odległości 50-100 mm strumienie oddziaływały ze sobą.

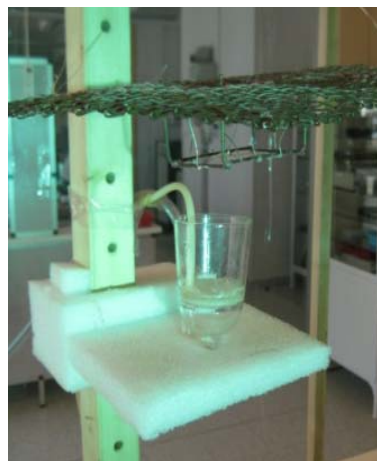
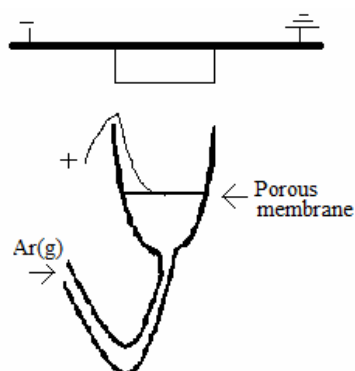
Próbki uzyskanego materiału zbierane na szklanych płytkach nakrywkowych obserwowano z użyciem mikroskopu optycznego. Badania pozwoliły stwierdzić obecność tylko niewielkiej ilości nanowłókien w uzyskanym materiale, podczas gdy główna część materiału była w procesie rozpylana w postaci kropeł. Na rysunkach 8-3 i 8-4 przedstawiono zdjęcia otrzymanego materiału. Zdjęcia pokazują, że również struktura elektroprzędzonych nanowłókien podlega silnemu wpływowi drugiej strugi elektroprzędzonego materiału. Uzyskane nanowłókna są znacznie gorszej jakości niż pochodzące z układu jednodyszowego.

8.2 Elektroprzędzenie w układzie bezdyszowym

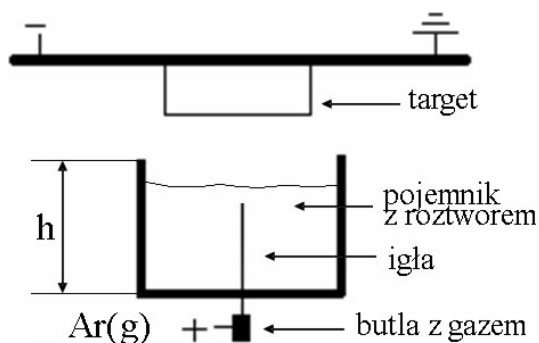
Drugim układem przebadanym w celu podwyższenia wydajności procesu był system, w którym strugi elektroprzędzonego polimeru tworzyły się z pęcherzyków powstających na powierzchni elektroprzędzonej cieczy [69]. Układ był podłączony do butli ze sprężonym gazem dostarczanym pod powierzchnię roztworu do elektroprzędzenia. Wykorzystano dwa zestawy eksperymentalne.

W zestawie pierwszym (Rys. 8-5) użyto szklanego filtra z porowatym dnem, napełnionego warstwą roztworu do elektroprzędzenia oraz argon dla wywołania potrzebnych pęcherzyków. W roztworze zanurzono izolowany drut posrebrzany podłączony do dodatniej elektrody zasilacza wysokiego napięcia. Biegunem ujemnym, a jednocześnie uziemieniem, był target wykonany z siatki miedzianej, zawieszony nad powierzchnią roztworu. Gumowy wąż podłączony do dolnej części filtra służył do dostarczania sprężonego argonu. Układ wykorzystywał konfigurację do elektroprzędzenia, gdzie tworzone nanowłókna przemieszczane są z dołu do góry.

W omawianym układzie nie udało się uzyskać nanowłókien. Prawdopodobnie było to spowodowane elektryzowaniem się powierzchni szklanego filtra, które uniemożliwiało powstanie stabilnych elektroprzędzonych strug.



Rys. 8-5 Schemat i fotografia pierwszego z zestawów do elektroprzędzenia bezdyszowego.



Rys. 8-6 Schemat i fotografia drugiego z zestawów do elektroprzędzenia bezdyszowego.

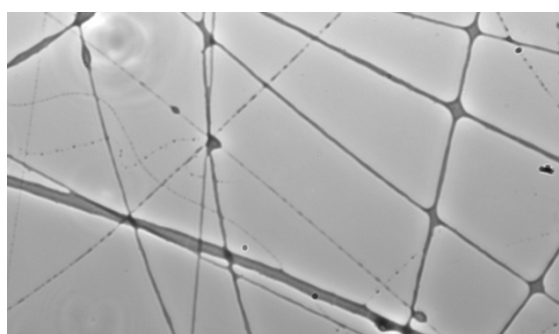
Wykonano drugi zestaw (Rys. 8-6), w którym użyto polistyrenowych pojemników o średnicy 45 mm i trzech testowanych wysokościach ($h = 25\text{ mm}$, 40 mm i 55 mm). Dno pojemnika przebito igłą podłączoną do dodatniego bieguna zasilacza wysokiego napięcia. Igła służyła również do dostarczania sprężonego argonu służącego do tworzenia pęcherzyków na powierzchni roztworu. Koniec igły dochodził bardzo blisko powierzchni cieczy, ale stale był zanurzony. W badanym układzie użyto napięcie z zakresu 15-20 kV.

Doświadczalnie stwierdzono, że dla niższych wartości potencjału nie dochodziło do elektroprzędzenia, a dla wyższych roztwór był jedynie rozpylany i nie tworzyły się nanowłókna. Drugim z badanych parametrów była odległość pomiędzy brzegiem naczynia a targetem. Proces elektroprzędzenia zachodził dla odległości 25-100 mm, lecz nie we wszystkich próbach udało się zaobserwować włókna. W tabeli 8-2 przedstawiono zestawienie przyjętych do doświadczeń parametrów, w których elektroprzędzenie miało miejsce i zebrano próbki.

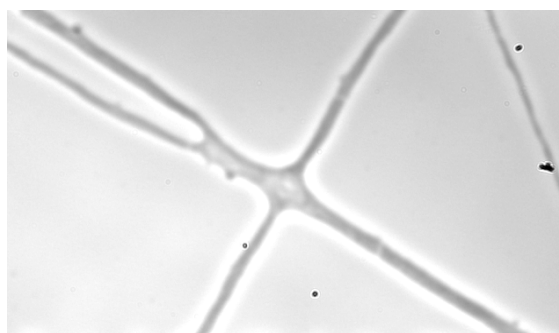
Na rysunkach 8-7 do 8-9 zestawiono fotografie z mikroskopu optycznego przedstawiające nanowłókna otrzymane w procesie elektroprzędzenia bezdyszowego. W każdym z prezentowanych przypadków w eksperymencie stosowano potencjał 20kV.

Tabela 8-2 Zestawienie eksperymentów dla elektroprzędzenia bezdyszowego

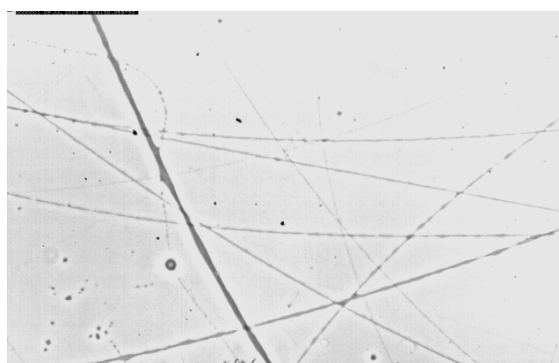
Wysokość naczynia	Napięcie	Odległość naczynia od targetu
[mm]	[kV]	[mm]
25	20	90
40	20	100
40	20	90
40	20	80
40	20	60
40	15	60
55	20	55
55	20	70



Rys. 8-7 Włókna otrzymane w procesie elektroprzędzenia bezdyszowego. Parametry procesu: odległość od targetu 90mm; wysokość naczynia 25mm. Powiększenie 20x.



Rys. 8-8 Włókna otrzymane w procesie elektroprzędzenia bezdyszowego. Parametry procesu: odległość od targetu 90mm; wysokość naczynia 25mm. Powiększenie 100x.



Rys. 8-9 Włókna otrzymane w procesie elektroprzędzenia bezdyszowego. Parametry procesu: odległość od targetu 80mm; wysokość naczynia 40mm. Powiększenie 20x.

Elektroprzędzenie w układzie bezdyszowym wymaga więcej pracy przy określeniu optymalnych parametrów – eksperymenty pokazują, że tę trudność udaje się jednak pokonać. Optymalizować należy zarówno wielkość naczynia, odległość od targetu, położenie wewnątrz naczynia igły dostarczającej pęcherzyki gazu, jak również samo ciśnienie gazu.

9 Optymalizacja pola elektrostatycznego

Omówienie badań w niniejszym rozdziale poświęcone jest analizie różnych systemów odbierania włókien. Powodem analizy jest obserwacja, że wykorzystując targety różnego rodzaju można wpływać na równomierność pokrycia powierzchni włóknami, a także na strukturę włókien otrzymywanych w procesie elektroprzędzenia. Dla zbadania tego wpływu przeprowadzono odpowiednie testy eksperymentalne i numeryczne. Analizowano różne układy, w tym kładąc główny nacisk na wariant z dodatkową elektrodą, której zadaniem było skupienie wiązki elektroprzędzonych nanowłókien na targecie.

9.1 Analizowane systemy elektroprzędzenia nanowłókien

Analizowano pięć podstawowych systemów odbioru nanowłókien i ich wpływ na jakość produkowanego materiału. Przedmiot analizy i wyniki są szczegółowo omówione i pokazane poniżej.

9.1.1 Układ standardowy.

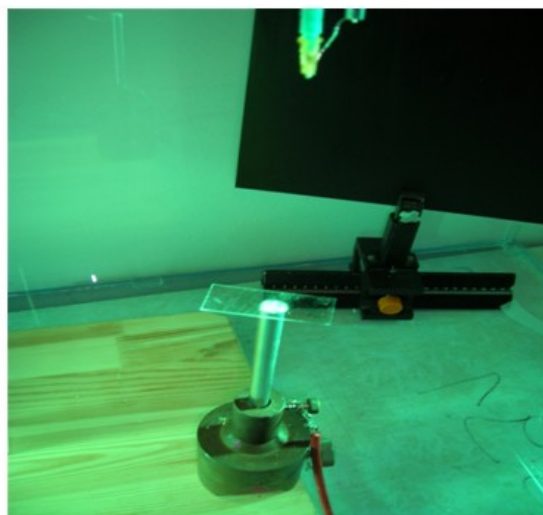
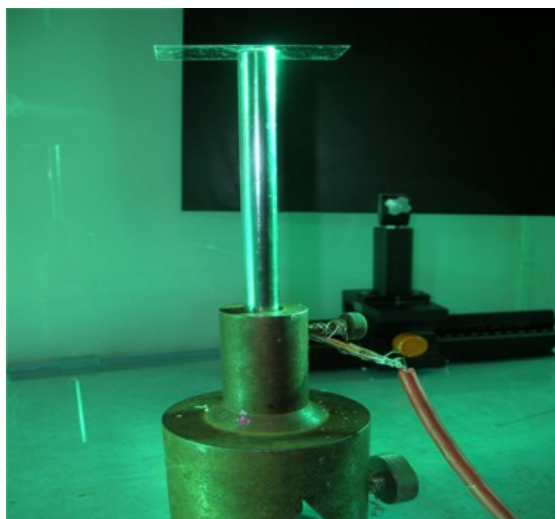
Standardowym targetem używanym w doświadczeniach było mikroskopowe szkiełko nakrywkowe, umieszczone na uziemionym rusztowaniu z krzyżujących się drutów, w odległości 15 cm od wylotu z dyszy. Układ taki pozwala na w miarę równomierne pokrycie szkiełka włóknami.



Rys. 9-1 Standardowy układ do odbioru elektroprzędzonych włókien.

9.1.2 Metalowy pręt o przekroju kołowym

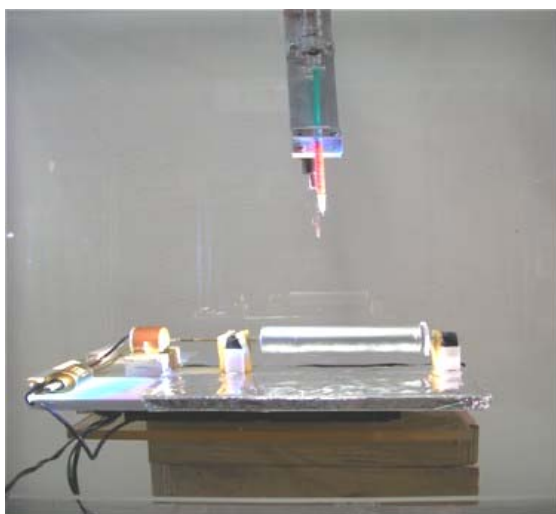
Zastosowanie metalowego pręta pozwala na dodatkowe skoncentrowanie włókien na obszarze szkiełka znajdującym się bezpośrednio nad metalową powierzchnią pręta. W tym obszarze uzyskuje się gęstą sieć włókien, pozostałe obszary szkiełka pokrywane są włóknami w bardzo nieznacznym stopniu. W eksperymentach wykorzystano pręt o średnicy 10mm.



Rys. 9-2 Układ do elektroprzędzenia z targetem w postaci metalowego pręta.

9.1.3 Ruchomy target – obracający się walec

Możliwe jest również zbieranie włókien bezpośrednio na uziemiony, obracający się walec, pokryty folią aluminiową. Dodatkowa możliwość przesuwania walca względem dyszy pozwala na równomierne pokrycie powierzchni folii oraz uzyskanie możliwie pojedynczej warstwy włókien. Zastosowanie folii aluminiowej znacznie utrudnia obserwację uzyskanego produktu pod mikroskopem optycznym. Uzyskane siatki można obserwować pod mikroskopem optycznym jako materiał zdjęty z folii.



Rys. 9-3 Układ do elektroprzędzenia z targetem w postaci obracającego się walca.

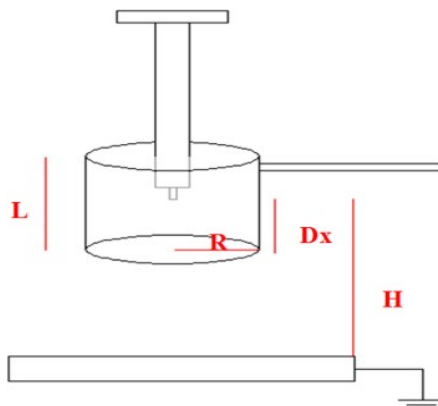
9.1.4 Układ równoległych drutów – otrzymywanie włókien równoległych.

Kolejnym badanym układem był system złożony z dwóch równoległych prętów. Odpowiednie zdjęcie pokazano we wcześniejszym rozdziale raportu, przy omawianiu budowy stanowiska. Zastosowanie tego układu umożliwi uzyskanie sieci równoległych włókien rozpiętej między prętami.

9.1.5 Zastosowanie walca skupiającego strugę włókien.

W celu poprawienia kontroli strugi wychodzącej z dyszy i uzyskania lepszej kontroli pokrywania targetu włóknami, do standardowego układu do elektroprzędzenia dodano walec wykonany z folii z poliwęglanu. Badano wpływ parametrów takiego układu na kąt rozwarcia stożka F_i i długość odcinka prostego d . Parametrami stałymi układu były: napięcie U przyłożone do układu (5 kV), odległość targetu od wylotu z dyszy H (15 cm) oraz natężenie przepływu cieczy tłoczącej Q (900 $\mu\text{L}/\text{min}$). Parametrami zmienianymi były: wysokość walca L , promień walca R oraz odległość D_x dolnej krawędzi walca od wylotu z dyszy.

Układ schematycznie przedstawiono na Rys. 9-4.



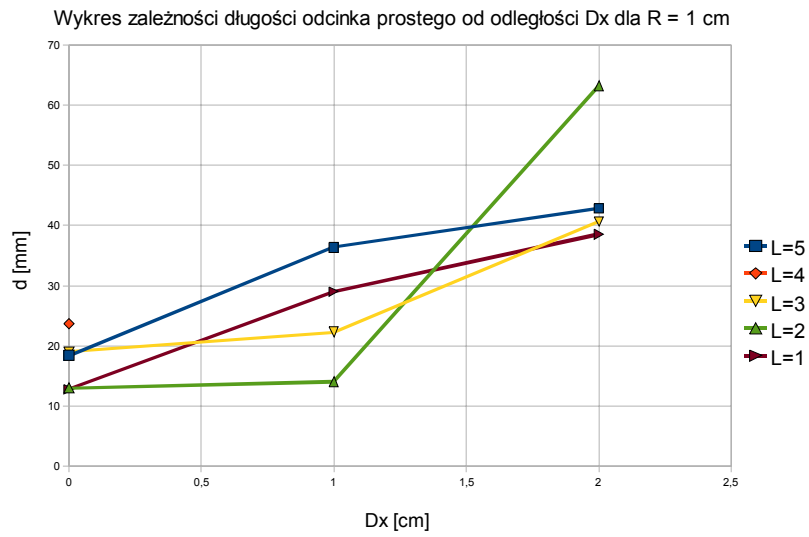
Rys. 9-4 Układ walcem.

Monitorowano wartości prądu przepływającego przez układ w trakcie trwania procesu. Nie zaobserwowano żadnej zależności monitorowanych wartości prądu w zależności od zmienianych parametrów układu. We wszystkich przypadkach wartości te nie ustalały się w trakcie procesu, wahając się od 10 do 20nA. Proces elektroprzędzenia obserwowano przy użyciu szybkiej kamery, a pomiarów wartości kąta F_i oraz długości odcinka d dokonano na podstawie pojedynczych zdjęć zarejestrowanych przez kamerę. Wyniki zestawiono w Tabeli 9-1. Na podstawie uzyskanych danych badano zależność wielkości kąta F_i oraz długości odcinka d od odległości D_x . Wykonano serię wykresów dla różnych wartości promienia R , długości L i odległości D_x .

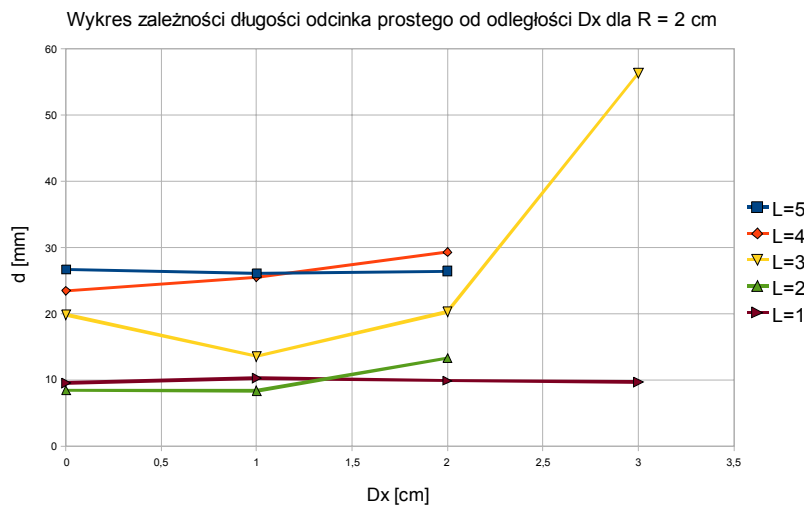
Tabela 9-1.

Lp	R [cm]	L [cm]	Dx [cm]	d [mm]	f_i [st]	Lp	R [cm]	L [cm]	Dx [cm]	d [mm]	f_i [st]	Lp	R [cm]	L [cm]	Dx [cm]	d [mm]	f_i [st]
1	3	5	0	13	58	17	3	1	2	13	30	33	2	1	1	10	70
2	3	5	1	12	73	18	3	1	3	13	35	34	2	1	2	9	51
3	3	5	2	11	44	19	2	5	0	26	39	35	2	1	3	9	55
4	3	5	3	9	32	20	2	5	1	26	43	36	1	5	0	18	81
5	3	4	0	17	27	21	2	5	2	26	22	37	1	5	1	36	28
6	3	4	1	10	51	22	2	4	0	23	33	38	1	5	2	42	13
7	3	4	2	7	33	23	2	4	1	25	39	39	1	4	0	23	27
8	3	3	0	21	29	24	2	4	2	29	30	40	1	3	0	19	72
9	3	3	1	17	37	25	2	3	0	19	33	41	1	3	1	22	60
10	3	3	4	8	50	26	2	3	1	13	64	42	1	3	2	40	15
11	3	2	1	11	89	27	2	3	2	20	31	43	1	2	0	13	79
12	3	2	2	13	33	28	2	3	3	56	36	44	1	2	1	14	84
13	3	2	3	13	42	29	2	2	0	8	76	45	1	2	2	63	21
14	3	2	4	8	62	30	2	2	1	8	75	46	1	1	0	12	106
15	3	1	0	14	38	31	2	2	2	13	48	47	1	1	1	29	81
16	3	1	1	14	35	32	2	1	0	9	37	48	1	1	2	38	23

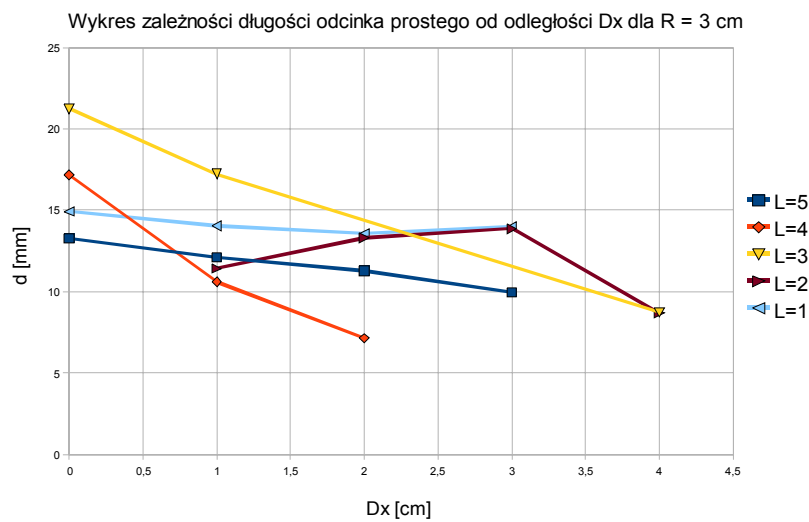
Poniżej zaprezentowano zestawienie wykresów obrazujących zależności umieszczone w Tabeli 9-1.



Rys. 9-5

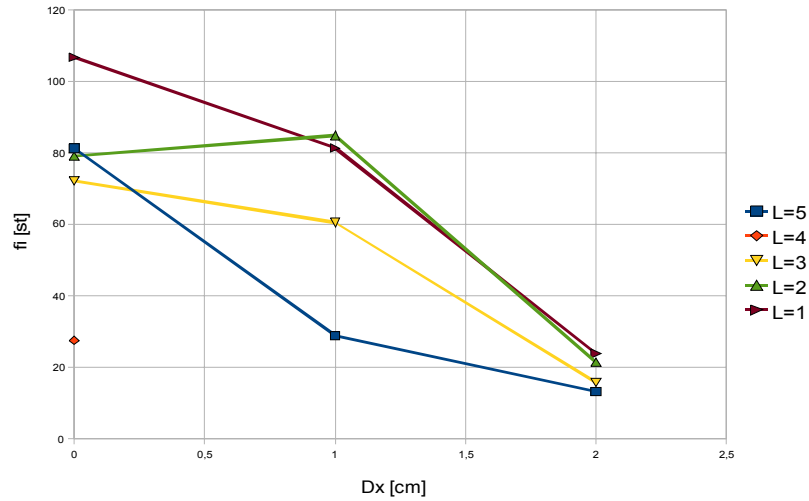


Rys. 9-6



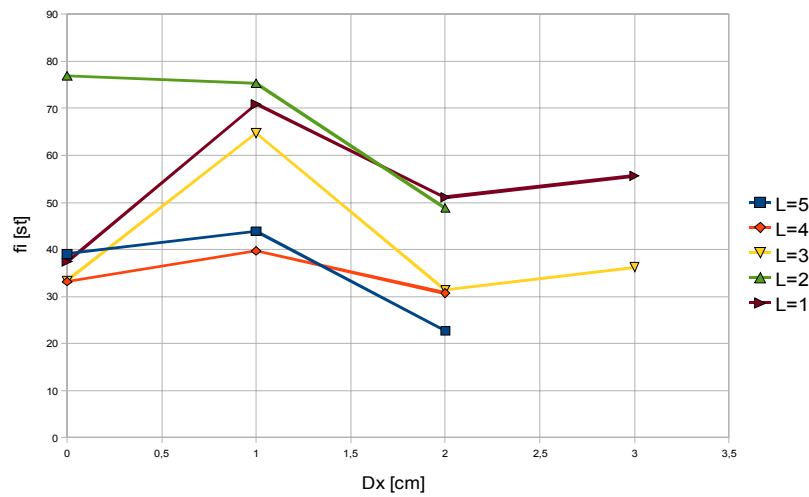
Rys. 9-7

Wykres zależności wielkości kąta rozwarcia stożka od odległości Dx dla R = 1 cm



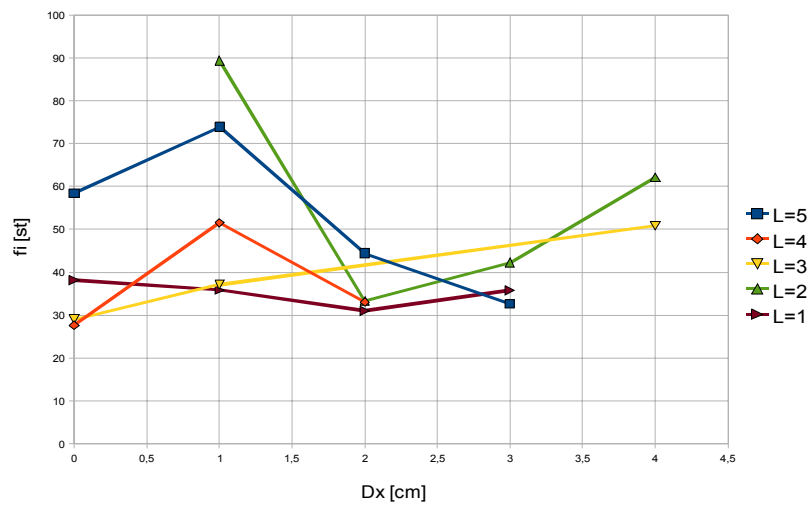
Rys. 9-8

Wykres zależności wielkości kąta rozwarcia stożka od odległości Dx dla R = 2 cm



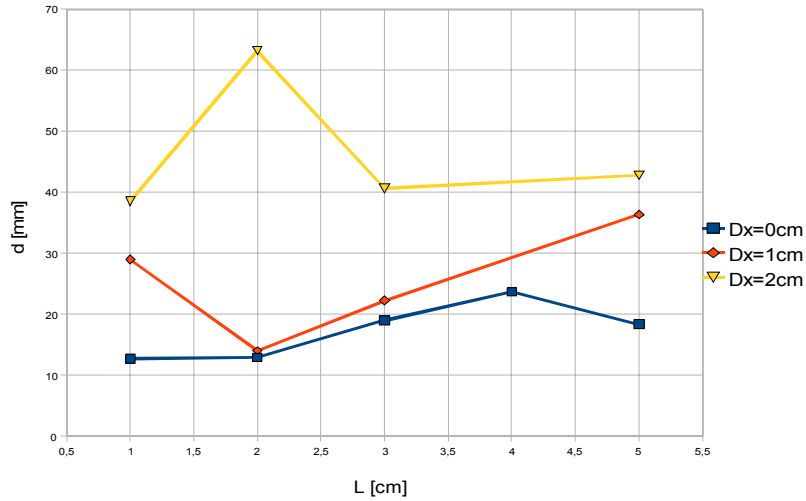
Rys. 9-9

Wykres zależności wielkości kąta rozwarcia stożka od odległości Dx dla R = 3 cm



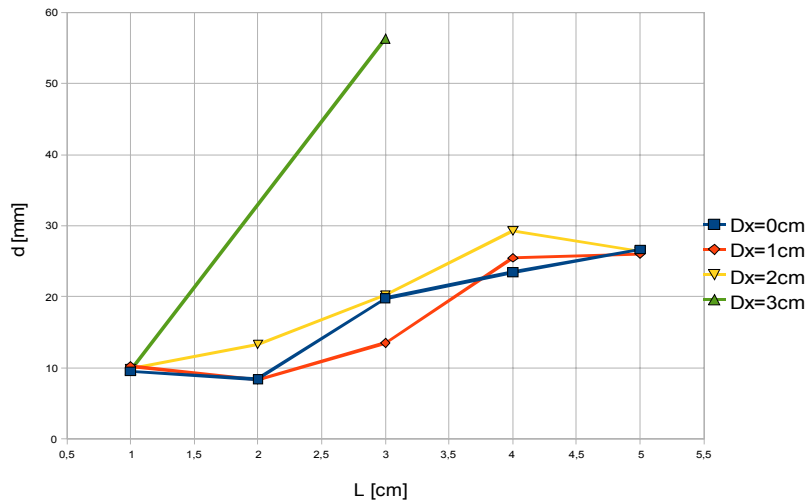
Rys. 9-10

Wykres zależności długości odcinka prostego od wysokości walca dla $R = 1$ cm



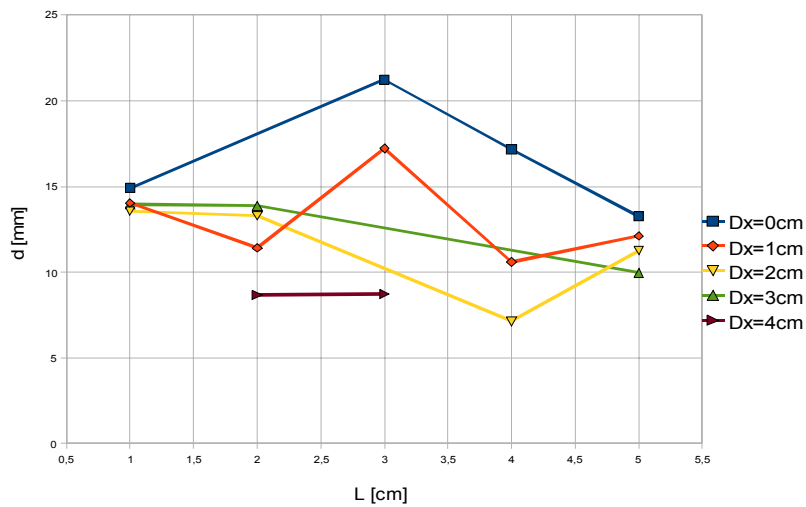
Rys. 9-11

Wykres zależności długości odcinka prostego od wysokości walca dla $R = 2$ cm

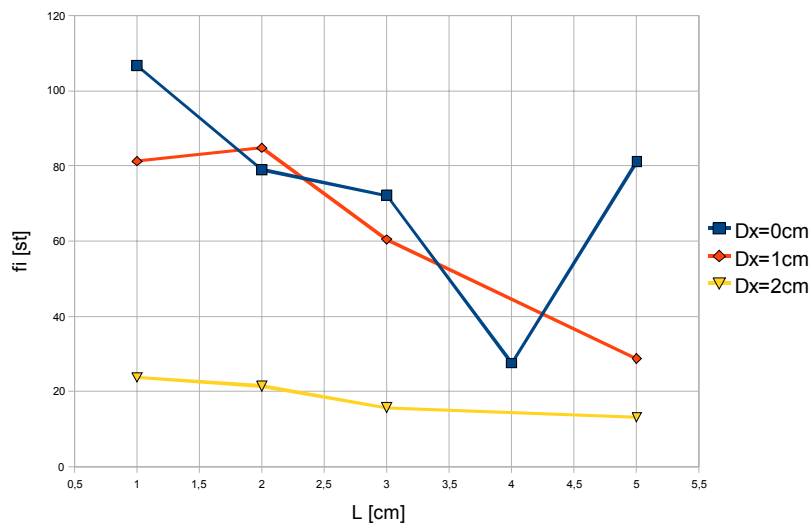


Rys. 9-12

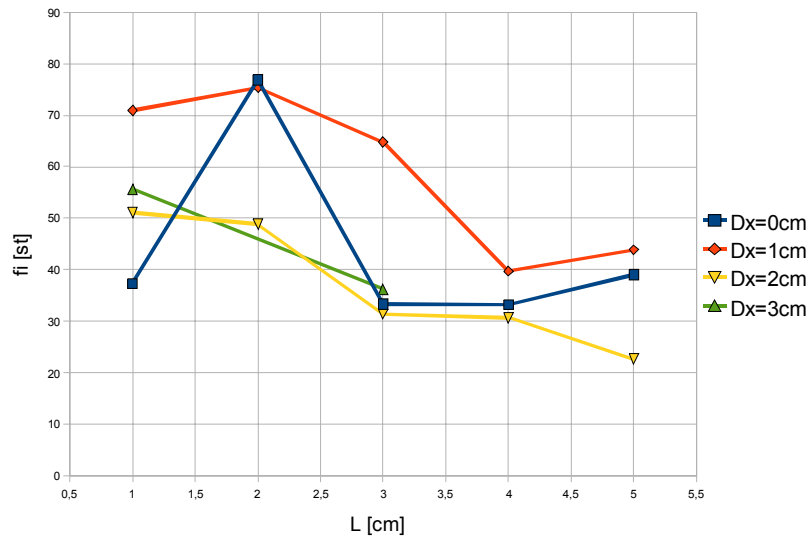
Wykres zależności długości odcinka prostego od wysokości walca dla $R = 3$ cm



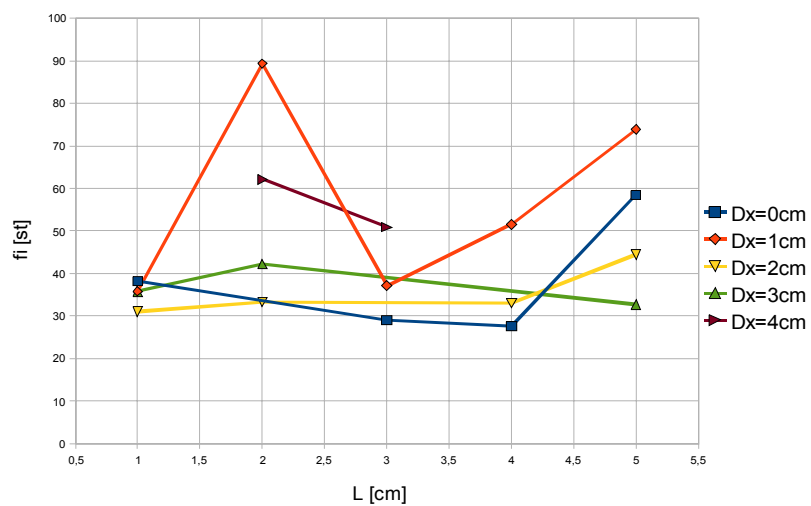
Rys. 9-13

Wykres zależności wielkości kąta rozwarcia stożka od wysokości walca dla $R = 1$ cm

Rys. 9-14

Wykres zależności wielkości kąta rozwarcia stożka od wysokości walca dla $R = 2$ cm

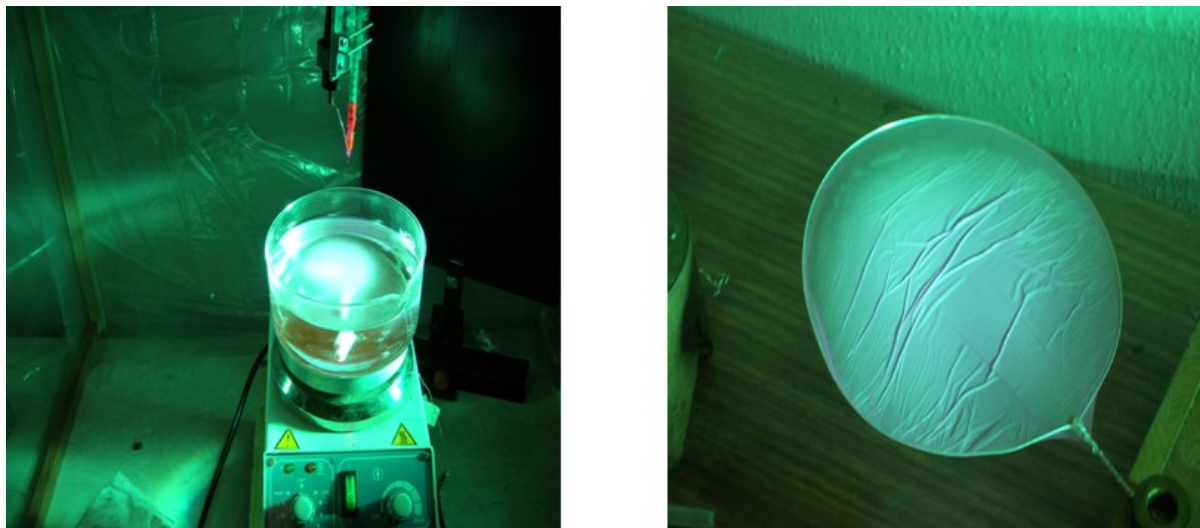
Rys. 9-15

Wykres zależności wielkości kąta rozwarcia stożka od wysokości walca dla $R = 3$ cm

Rys. 9-16

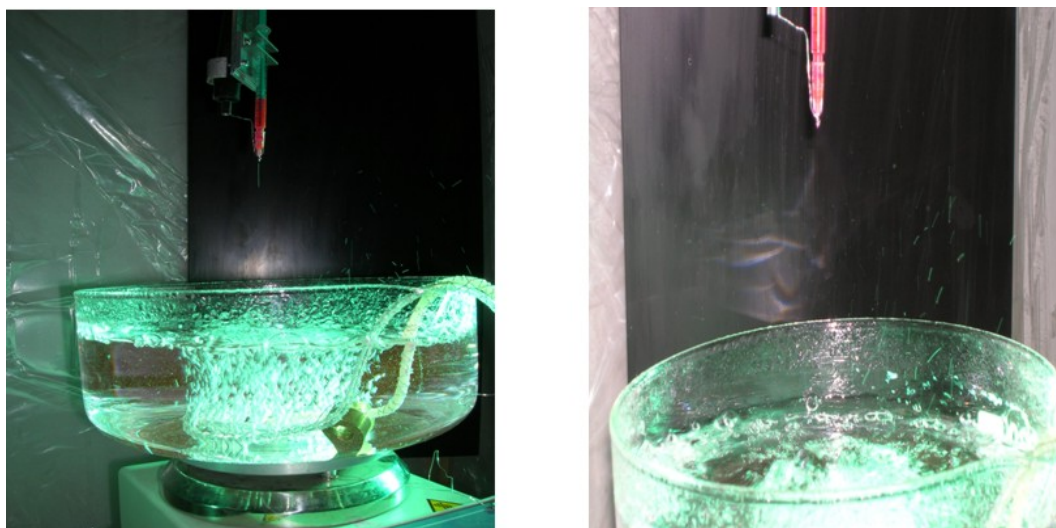
9.1.6 Elektroprzędzenie na powierzchnię wody

Elektroprzędzenie włókien bezpośrednio na powierzchnię wody daje możliwość tworzenia wielowarstwowej struktury włókien, która zostaje zachowana po wyjęciu z wody i osuszeniu. Dodatkowe zastosowanie mieszania mieszadłem magnetycznym, umieszczonym na dnie zbiornika z wodą sprzyja powstawaniu struktur o regularnym kształcie krążka. Układ przedstawiono na Rys. 9-17.



Rys. 9-17 Siatki z włókien powstające podczas elektroprzędzenia na wodę.

Przędzenie na wodę wykorzystane zostało także w próbach uzyskania krótkich odcinków włókien, które planowano wykorzystać do obserwacji mikroprzepływów. W tym celu stworzono układ mający umożliwić bezpośrednie cięcie włókien elektroprzędzonych na wodę, za pomocą pęcherzyków gazu wydobywającego się spod powierzchni wody. Wykorzystano standardowy układ do elektroprzędzenia, zastępując metalowy target zbiornikiem z wodą destylowaną. Powierzchnia wody znajdowała się w odległości 15 cm od wylotu z dyszy. Średnica zbiornika wynosiła 15cm. W zbiorniku umieszczono system rurek doprowadzających powietrza lub argonu z butli (Rys. 9-18).



Rys. 9.18 Układ do elektroprzędzenia z systemem doprowadzającym gaz pod powierzchnię wody.

Jako polimer tworzący włókna zastosowano poli(L-laktyd), PLLA, z dodatkiem poli(tlenku etylenu), PEO lub układu surfaktant – stabilizator emulsji. Włókna polimerowe na potrzeby takiego eksperymentu powinny być nierozpuszczalne w wodzie a użyty rozpuszczalnik powinien umożliwić rozpuszczenie Rodaminy B w roztworze polimeru. Rodamina B, będąc barwnikiem fluorescencyjnym, ułatwi obserwacje przepływów włókien polimerowych w mikrokanale.

Próby uzyskania krótkich odcinków włókien przeprowadzono dla następujących roztworów:

- 1) PEO (1,25%) + PCL (1,25%) w chloroformie.

Dla tego roztworu obserwowano bardzo stabilny proces przedzenia, ale słaba zwilżalność włókien powodowała zbieranie się dużej ilości włókien na powierzchni wody i ich sklejanie.

- 2) PLLA (4%) w chloroformie.

Proces przedzenia był niestabilny, uzyskano włókna z defektami („koraliki na sznurku”), słabo zwilżalne tak jak w przypadku poprzedniego roztworu.

- 3) PLLA (4%) w chlorku metylenu (CH_2Cl_2) z dodatkiem octanu etylu (6:1)

Obserwowano bardzo niestabilny proces przedzenia.

Dla powyższych roztworów obserwowane pod mikroskopem próbki wody pobranej ze zbiornika nie zawierały włókien, być może z powodu słabej zwilżalności i zlepiania się wszystkich ew. powstałych odcinków włókien na powierzchni wody. W celu zwiększenia zwilżalności wykorzystano roztwór zawierający surfaktant.

- 4) PLLA (4%) w chlorku metylenu z octanem etylu (5:1) z dodatkiem seskwioleinianu (sesquioleate sorbitan, Aldrich) sorbitanu jako surfaktanta i kopolimeru akrylanu z akrylanem etanolaminy (Eudragit RSPO, Rohm) jako stabilizatora emulsji.

Proces przedzenia był niestabilny, za to włókna, dzięki dodatkowi zwilżacza, były lepiej zwilżalne i wnikały pod powierzchnię wody łatwiej niż w przypadku poprzednich roztworów, jednak również w tym przypadku pobrane ze zbiornika próbki wody nie zawierały pojedynczych włókien.

Wobec niepowodzeń poprzednich eksperymentów przeprowadzono próbę cięcia włókien na płycie szklanej za pomocą skalpela. Wykorzystano równoległe włókna PLLA (14,5% PLLA w CHCl_3 /DMF w stos. 10:1) uzyskane z użyciem targetu w postaci równoległych drutów. Włókna zawieszane między drutami zebrano na szkiełko mikroskopowe, zachowując ich równoległe ułożenie. Cięcie włókien przy pomocy skalpela, przy odpowiednio mocnym oświetleniu lub bezpośrednio pod obiektywem mikroskopu pozwala na uzyskanie włókien o długościach wystarczających do wstępnych eksperymentów z mikrokanalami, jednak uzyskiwane są włókna o dużym rozrzucie długości, w tym włókna długie, zatykające kanały i uniemożliwiające dalszy przepływ, dlatego opracowywana jest bardziej kontrolowana metoda otrzymywania krótkich odcinków włókien. Wyniki badań przepływów w mikrokanale opisano w odrębnej publikacji.

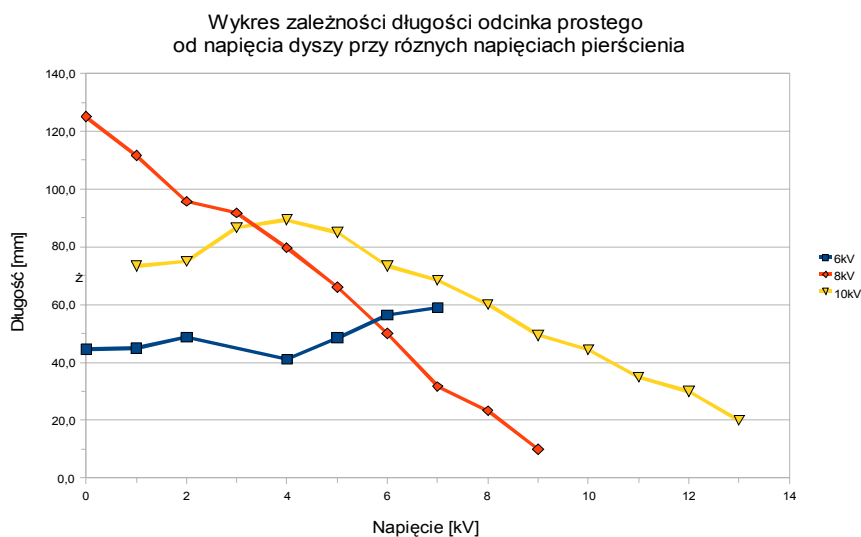
9.2 Optymalizacja geometrii układu elektrod i pola elektrycznego

Przeprowadzono badania mające na celu zbadanie zależności parametrów procesu elektroprzędzenia nanowłókien polimerowych od parametrów układu. Standardowy układ pomiarowy składa się ze źródła napięcia, strzykawki zawierającej roztwór polimeru i zakończonej igłą (dyszą), do której przyłożone jest napięcie oraz uziemionego targetu. W celu uzyskania lepszej kontroli strugi wychodzącej z dyszy, do układu dodano dodatkowy pierścień, podłączony do niezależnego źródła napięcia, który pełnił rolę elektrody sterującej. Przeprowadzono również symulacje rozkładu pola elektrycznego dla różnych konfiguracji układu. Do badań wykorzystano 7,4 % roztwór PEO w wodzie.

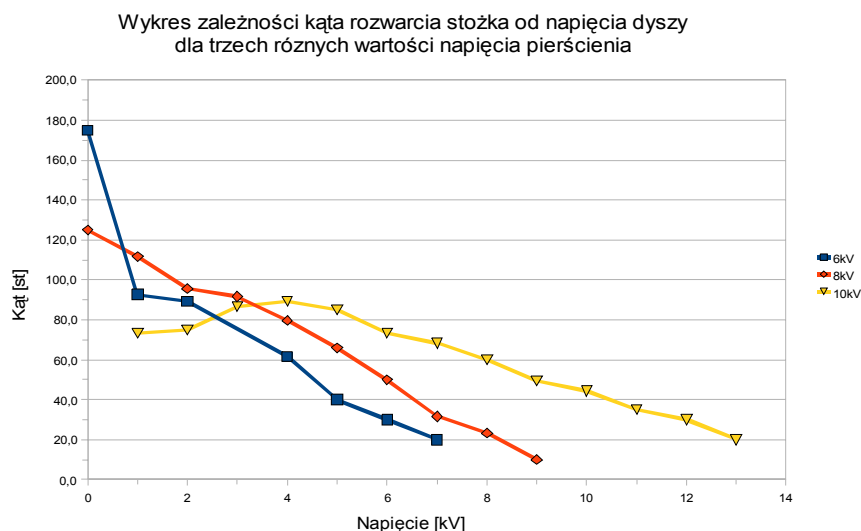
9.2.1 Wpływ dodatkowego pierścienia. Różne napięcia przyłożone do dyszy i pierścienia

Badano wpływ różnicy napięć przyłożonych do dyszy (U_d) i do pierścienia (U_r), przy zerowym napięciu targetu, na parametry charakterystyczne dla procesu elektroprzędzenia – kąt rozwarcia stożka i długość odcinka prostego. Badania przeprowadzono dla trzech wartości napięć U_d : 6 kV, 8 kV i 10 kV, dla każdej z tych wartości zmieniano wartość napięcia przyłożonego do pierścienia. Pierścień o średnicy 15 cm umieszczono na poziomie wylotu z dyszy. Zastosowano standardowy system odbierania włókien – uziemione rusztowanie z krzyżujących się drutów. Eksperyment monitorowano mierząc wartości prądu (odpowiednio I_d i I_r). Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 9-2.

Na rysunkach poniżej zobrazowano zależności opisane w Tabeli 9-2.



Rys. 9-19



Rys. 9-20

Z przedstawionych wykresów wynika zgodny z intuicją spadek zarówno długości odcinka prostego jak i kąta rozwarcia stożka dla wartości napięcia zbliżających się do wartości napięcia przyłożonego do pierścienia (elektrody sterującej).

Tabela 9-2

Ud [kV]	Id [nA]	Ur [kV]	Ir [nA]	dł. odcinka prostego [mm]	kąt rozwarcia stożka [deg]	Ud [kV]	Id [nA]	Ur [kV]	Ir [nA]	dł. odcinka prostego [mm]	kąt rozwarcia stożka [deg]
6	23	0	-15	44	175	8	17	8	0,3	68	23
6	34	1	-20	44	92	8	12	9	0,15	70	10
6	32	2	0,3	48	89	10	244	1	-178	51	73
6	25	4	0,3	41	61	10	96	2	-13	53	75
6	20	5	0,1	48	40	10	44	3	3,9	56	86
6	13	6	0,1	56	30	10	41	4	1,5	57	89
6	12	7	0,1	58	20	10	43	5	-1	67	85
8	44	0	-30	43	125	10	32	6	0	74	73
8	38	1	-12	46	111	10	29	7	0,4	76	68
8	40	2	-0,5	54	95	10	40	8	0	65	60
8	37	3	-0,3	60	91	10	38	9	-0,6	69	49
8	34	4	-0,4	56	79	10	34	10	1,5	80	44
8	30	5	-0,05	57	66	10	24	11	1,5	99	35
8	25	6	0	55	50	10	19	12	3,5	103	30
8	20	7	0,05	62	31	10	13	13	6,9	143	20

Pewnym zaskoczeniem była kontynuacja procesu przy napięciu dyszy poniżej przyłożonego do elektrody sterującej, zazwyczaj nieprzekraczająca 1 kV, zaś dla napięcia dyszy 10 kV elektroprądzenie trwało nadal aż do chwili, kiedy elektroda sterująca osiągnęła napięcie 13 kV.

9.2.2 Wpływ zmian napięcia przyłożonego do pierścienia umieszczonego pomiędzy dyszą a targetem. Zmienna polaryzacja elektrod

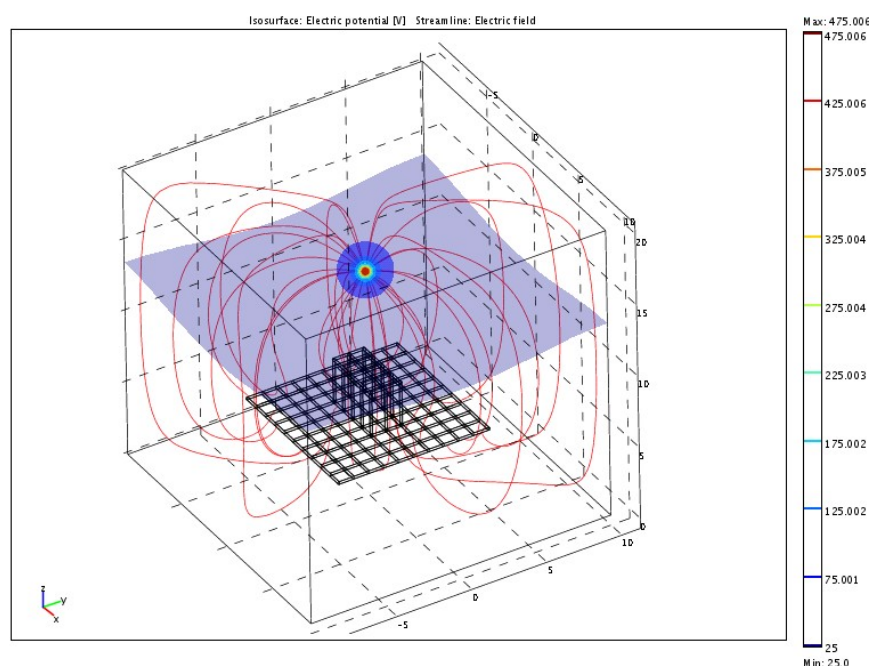
Badano, jaki wpływ na parametry prądu ma różnica napięć między dyszą (U_d), pierścieniem (U_r), oraz targetem (U_t), jak również wysokość (H_r) i promień pierścienia R . Przeprowadzono również badania wpływu polaryzacji elektrod na proces elektroprądzenia oraz na średnicę włókien. Wyniki przedstawiono w Tabeli 9-3.

Tabela 9-3

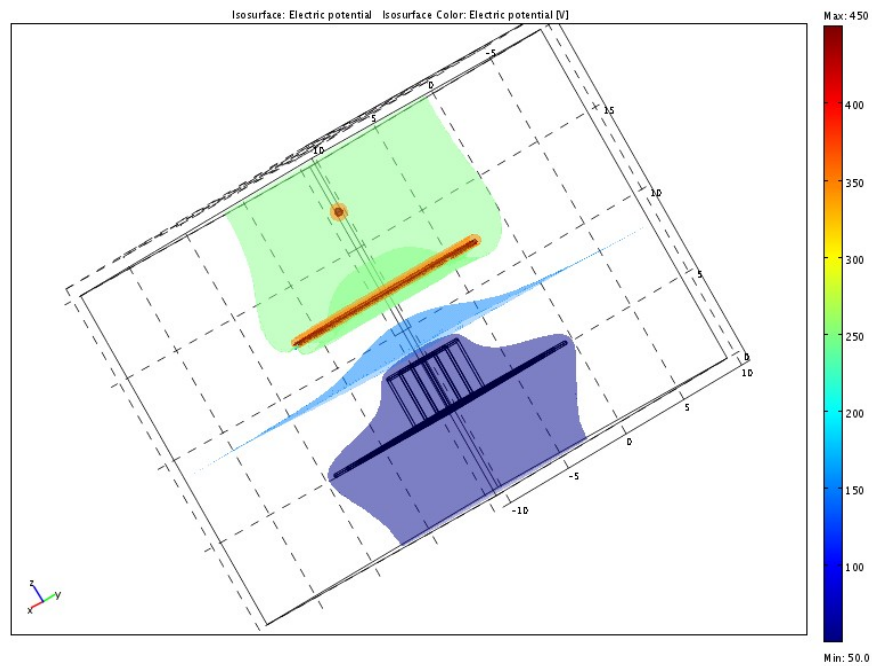
U_t [kV]	U_r [kV]	U_d [kV]	R [cm]	H_r [cm]	H_d [cm]	dł. odcinka prostego [mm]	kat rozwarcia stożka [deg]
0	2	7	15	0	15	23,0	56
0	5	7	15	0	15	34,0	60
0	2	7	15	5	15	32,0	49
0	5	7	15	5	15	25,0	27
0	7	7	15	5	15	20,0	36
0	2	7	15	10	15	13,0	51
0	5	7	15	10	15	12,0	58
0	6	7	15	10	15	12,0	27
0	0	6	7,5	3	15	44,0	73
0	-	7	-	-	15	38,0	84
0	-	6	-	-	15	40,0	60
0	-	7	-	-	8	37,0	88
0	5	7	7,5	4	8	34,0	48
0	-	-7	-	-	15	30,0	36
-1	-	6	-	-	15	25,0	70
-2	-	6	-	-	15	20,0	62
-5	-	6	-	-	15	17,0	64
-8	-	6	-	-	15	12,0	45
-15	-	6	-	-	15	244,0	26
-18	-	6	-	-	15	-	-

9.3 Symulacje rozkładu pola elektrycznego

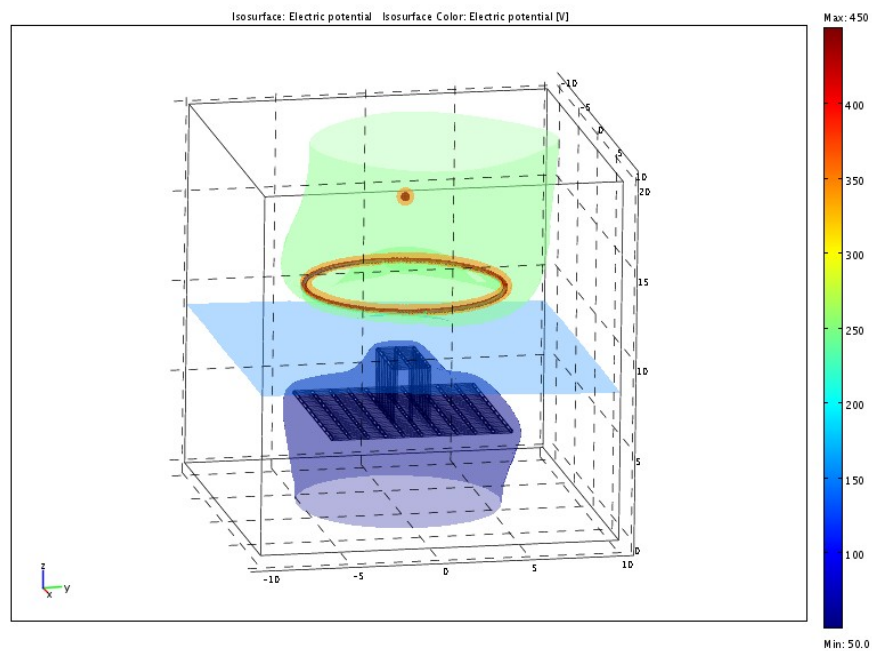
Poniżej prezentowane są wyniki symulacji rozkładu pola elektrycznego otrzymane metodą elementów skończonych z zastosowaniem programu FEMM (Finite Elements Method Magnetics, [124]). Modelowanie przeprowadzono dla układu standardowego, zastosowanego w eksperymentach, oraz dla układów z użyciem dodatkowej elektrody (elektrody kierującej) pomagającej skoncentrować tworzące się włókna na tarczy.



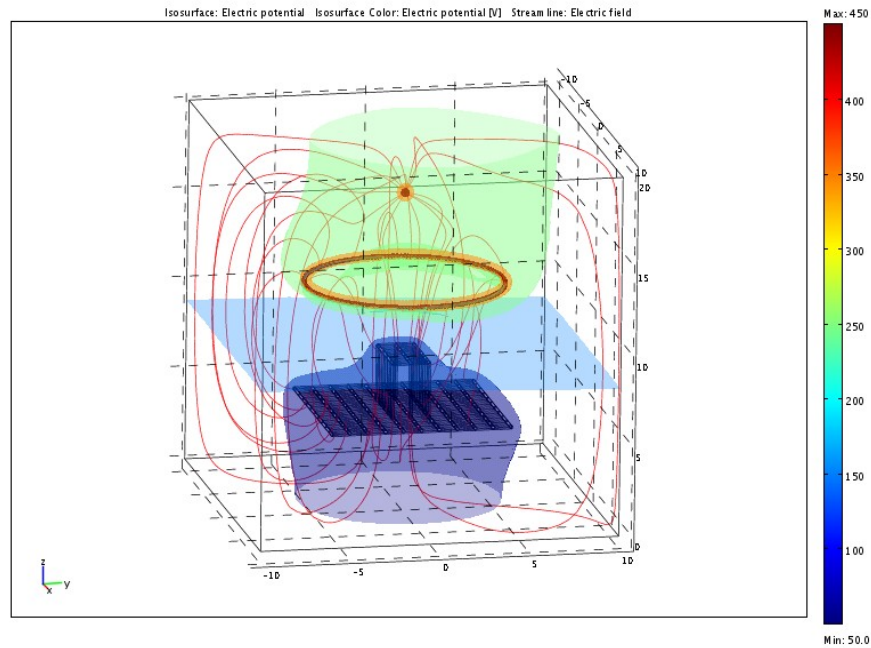
Rys. 9-21 Linie pola i linie stałego potencjału (izopowierzchnie) w układzie standardowym.



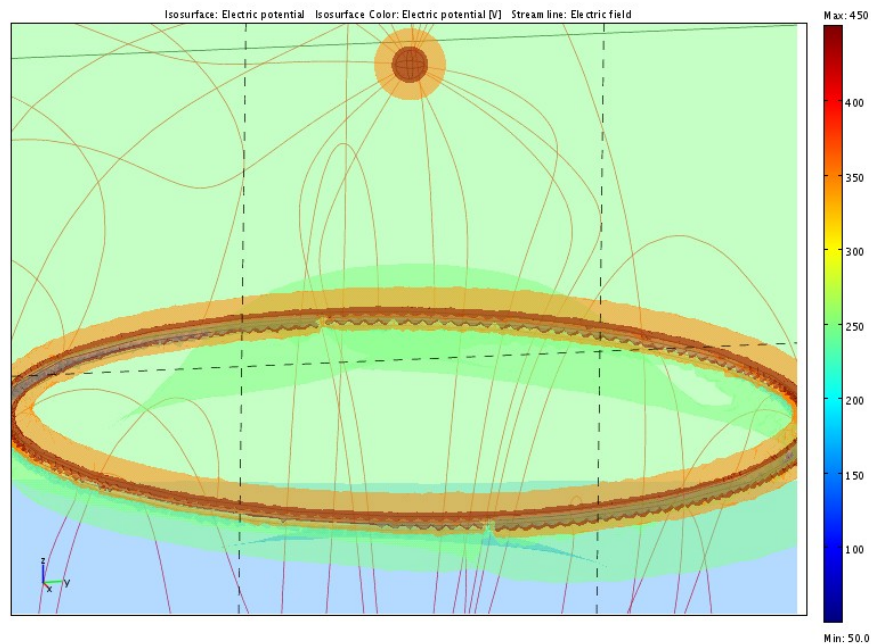
Rys. 9-22 Izopowierzchnie potencjału z elektrodą kierującą na 500V.



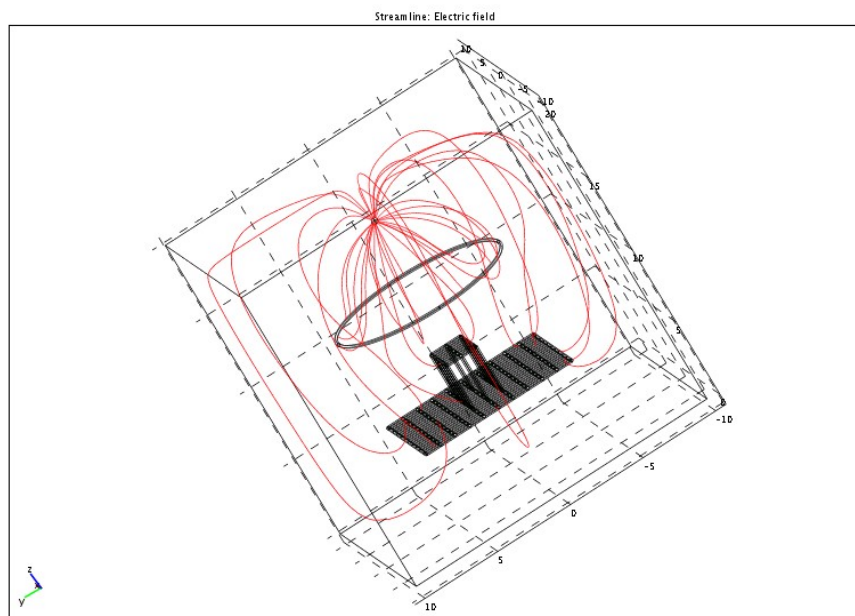
Rys. 9-23 Izopowierzchnie potencjału z elektrodą kierującą na 500V widziane z innej perspektywy.



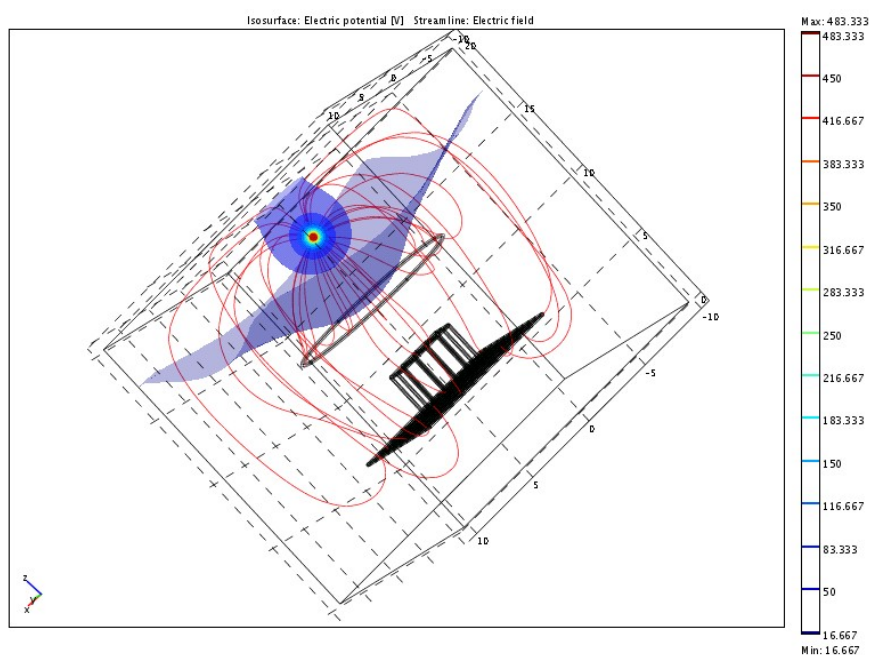
Rys. 9-24 Izopowierzchnie potencjału + linie pola elektrycznego z elektrodą kierującą na 500V.



Rys. 9-25 Powiększenie centralnej części poprzedniego rysunku – widać, że jest pewien zakres kątów bryłowych, takich, że streamline'y zakrecają do wnętrza elektrody sterującej, co powinno stabilizować wirującą strugę.



Rys. 9-26 Linie pola elektrycznego z uziemieniem na elektrodzie sterującej.



Rys. 9-27 Elektroda sterująca jest uziemiona. Rysunek z dodanymi izopowierzchniami potencjału. W konfiguracji tej „dolek” jest teraz zwrócony w drugą stronę, co odpowiada osadzeniu się polimeru na elektrodzie sterującej.

Wykonane symulacje pokazują kształty pola elektrycznego występującego podczas elektroprzędzenia. Modelowanie kształtu pola może być użyteczne w planowaniu eksperymentów z zastosowaniem różnych typów i konfiguracji elektrod pomocniczych.

Wyniki są zgodne z intuicją, dla przypadków rosnącego napięcia okrągłej elektrody dodatkowej proces może biec normalnie lub może dojść do stochastycznego wyrzutu strugi do góry z okążeniem okrągłej elektrody na drodze do uziemienia.

9.4 Wnioski - wpływ parametrów układu na proces elektroprzędzenia

Z przedstawionych powyżej danych wynikają następujące wnioski:

- ze wzrostem napięcia przyłożonego do dyszy wzrasta długość odcinka prostego,
- ze wzrostem napięcia przyłożonego do dyszy maleje wartość kąta rozwarcia stożka utworzonego przez elektroprzędzone nanowłókna,
- przy stałym napięciu przyłożonym do dyszy, ze wzrostem napięcia przyłożonego do pierścienia długość odcinka prostego rośnie,
- przy stałym napięciu przyłożonym do dyszy, ze wzrostem napięcia przyłożonego do pierścienia wartość kąta rozwarcia stożka utworzonego przez włókna maleje,
- włókna otrzymane w procesie przędzenia przy napięciach ujemnych są cieńsze niż włókna przędzone przy napięciu dodatnim, równym co do modułu napięciu ujemnemu.

10 Badania elektroteologiczne

Badanie nad możliwością wystąpienia efektów elektroteologicznych podjęte zostały z uwagi na fakt, że możliwe jest ich pojawienie się przy wysokich wartościach potencjału elektrycznego podczas elektroprzędzenia. Górne wartości potencjałów stosowanych w procesie elektroprzędzenia obejmują zakres, w którym pojawiają się właściwości elektroteologiczne. Z tego powodu przewidywano, że powinny mieć one wpływ na zmianę lepkości stosowanego roztworu zależnie od przyłożonego potencjału. Efekt taki byłby charakterystyczny dla polimeru i rozpuszczalnika, a także ewentualnych dodatków substancji jonowych (kwasów, zasad, soli), mogących wchodzić w reakcje z łańcuchami polimeru. Znalezienie i oszacowanie wielkości charakterystycznych dla efektów elektroteologicznych pozwoliłoby na dodanie poprawki pomagające w ulepszeniu modelu procesu elektroprzędzenia.

Badano zachowanie wzorcowego polimeru w procesie elektroprzędzenia – poli(tlenku etylenu) PEO w roztworze wodno-etanolowym, dla górnych wartości potencjału stosowanego w procesie elektroprzędzenia. Dla wzmocnienia poszukiwanych efektów do roztworu dodano niewielką ilość soli. Mierzono czas przepływu określonej objętości roztworu do elektroprzędzenia przez pipetę (pipeta była odwrócona, na całej użytej do pomiaru długości miała jednakową średnicę). Zmierzone wartości czasu wykazywały dryf spowodowany odparowaniem etanolu z układu rozpuszczalników, w związku z tym nie stosowano typowej metody polegającej na uśrednianiu 3 do 5 pomiarów. Następnie w tym samym układzie eksperymentalnym włączano typowej wartości napięcie (20 kV) i ponownie wykonywano pomiar czasu.

Zestaw pomiarowy wykorzystywał dwie konfiguracje:

Konfiguracja I – z typową różnicą potencjału (jak w układzie do elektroprzędzenia).

Elektroda „+” umieszczona ponad pipetą; uziemienie w odległości 10 cm od elektrody (wyływ roztworu do uziemionej zlewki).

Konfiguracja II – z dużo wyższymi wartościami potencjału.

Napięcie przyłożone w kierunku prostopadłym do przepływu; układ dwóch elektrod złożony z pipety owiniętej folią aluminiową (elektroda „-”) i wewnątrz, koncentrycznie umieszczonej kapilary z drutem posrebrzonym (elektroda „+”); potencjał 20-40 kV/cm uzyskany przy zastosowaniu elektrod w odległości 0,5 cm (średnica pipety 1 cm) i napięciu 10-20kV; folia aluminiowa o długości 15 cm, owijająca pipetę, umieszczona poza odcinkiem pomiarowym, wykorzystana jako uziemienie.

Dla konfiguracji I przeprowadzono eksperyment z użyciem 3% roztworu PEO (4·10⁵ Da) w układzie rozpuszczalników 40% etanol/woda. Wykonano cztery pomiary czasu wypływu cieczy z kapilary bez włączonego napięcia. Po włączeniu napięcia 25 kV przy potencjale 2,5 kV/cm wykonano 4 kolejne pomiary. Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 10-1 Czas wypływu roztworu PEO dla konfiguracji I

Lp.	1	2	3	4	5	6	7
Napięcie [kV]	0	0	0	25	25	25	25
Czas [s]	35,36	35,72	36,14	36,20	37,01	37,19	37,68

Tabela 10-2 Czas wypływu roztworu PEO dla konfiguracji II

Lp.	1	2	3	4
Napięcie [kV]	0	0	10	0
Czas [s]	32,00	33,05	32,14	30,30

Tabela 10-3 Konfiguracja IIa

Lp.	1	2	3	4	5
Czas/s	61	61	75	83	76
Napięcie/kV	0	0	0	20	0

Tabela 10-4 Konfiguracja IIb

Lp.	1	2	3	4	5
Czas/s	104	104	119	127	119
Napięcie/kV	0	0	0	20	0

Zmierzone czasy wykazywały dodatni dryf, tj. wydłużanie procesu wypływu, spowodowany odparowaniem rozpuszczalnika – etanolu. Wartości przed i po włączeniu napięcia nie odbiegały od siebie w granicach dokładności eksperymentu, a zatem nie zaobserwowano właściwości elektoreologicznych roztworu.

Dla konfiguracji II przeprowadzono eksperyment z użyciem 3% roztworu PEO (4·105 Da) w układzie rozpuszczalników 40% etanol/woda. Wykonano dwa analogiczne pomiary jak poprzednio najpierw bez napięcia, a następnie z napięciem 10 kV przy potencjale 20 kV/cm wykonano kolejny pomiar. Następnie napięcie wyłączono i wykonano kolejny pomiar czasu wypływu. Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Uzyskane wyniki nie odbiegały od siebie w granicach dokładności eksperymentu. Oznacza to, że podczas procesu elektroprzędzenia nie daje się zaobserwować właściwości elektoreologicznych badanego roztworu.

Następny eksperyment przeprowadzono z użyciem roztworu do elektroprzędzenia zawierającego 3% wagowych PEO (4·105 Da), i 0,1% chlorku sodu NaCl (proporcja polimer:sól równa 30:1) w układzie rozpuszczalników 40% etanol w wodzie. Dodatek soli miał za zadanie wytworzenie ładunku na elektrycznie obojętnych łańcuchach PEO (przez utworzenie kompleksu z jonami Na⁺). Naładowane elektrycznie łańcuchy polimeru powinny „odczuwać” silne zewnętrzne pole elektryczne, co zmieniałoby charakterystykę reologiczną układu. Dla konfiguracji II przeprowadzono eksperymenty z różnym ułożeniem uziemiającej folii aluminiowej. W ten sposób uzyskano dwa warianty konfiguracji II: wariant a – gdy owinięty odcinek pipety znajdował się 5 cm od jej końca, wariant b – gdy owinięty odcinek pipety był położony 20 cm od jej końca i mierzono wypływ większej ilości roztworu, na dłuższym odcinku pomiarowym. Dla każdej konfiguracji wykonano trzy pomiary bez napięcia, następnie jeden przy napięciu 20 kV (potencjał 40 kV/cm), po czym dla porównania wykonano jeszcze jeden pomiar bez napięcia. Wyniki przedstawiono w tabelach poniżej.

Pomiary dla obu konfiguracji pokazały silny dryf (porównaj np. pomiar 2 względem pomiaru 3 dla konfiguracji IIa lub IIb) i zmianę lepkości, za którą mogły być odpowiedzialne zjawiska elektoreologiczne (porównaj np. pomiary 3, 4 i 5 dla konfiguracji IIa lub IIb). Widać, że efekty elektoreologiczne są niewielkie, ale mimo wszystko większe od zmian zachodzących bez napięcia.

Przebadano zachowanie elektoreologiczne wzorcowego układu do elektroprądzenia: PEO w roztworze wodno-etanolowym. Dla wzmocnienia spodziewanych efektów zastosowano dużo wyższą niż w eksperymentach wartość potencjału oraz dodatek soli. Dla badanego układu polimer-rozpuszczalnik-sól stwierdzono możliwość wystąpienia słabych efektów elektoreologicznych. Możliwe jest, że efekty te wyraźnie zmanifestują się dla innych polimerów, które nie są typowo stosowane w procesie elektroprądzenia, a posiadają naładowany łańcuch polimeru np. alginian sodu albo sól sodowa poli(kwasu akrylowego).

11 Wnioski końcowe

W ramach obecnego projektu proces elektroprzędzenia został wszechstronnie scharakteryzowany pod kątem jego optymalizacji jak i praktycznego wykorzystania do wytwarzania materiałów do badań biologicznych. Jednym z istotnych elementów badań parametrycznych było stwierdzenie niewielkiego wpływu kompleksowania jonów z łańcuchem elektroprzędzonego polimeru na charakterystykę procesu. Wskazuje to na pomijalny wpływ obecności i ruchliwości ładunków przenoszonych przez strugę polimeru na sam proces powstawania niestabilności toru strugi i generowanie jej spiralnego ruchu.

Stwierdzono, że zarówno odpowiednia konfiguracja pola elektrycznego (ogniskowanie elektrodą walcową lub odpowiednio spolaryzowaną elektrodą pierścieniową) umożliwia sterowanie przestrzennym rozrzutem wirującej strugi. Adaptacja podstawowej konfiguracji elektrod przez wykorzystanie efektu indukcji ładunków w cylindrycznym izolatorze otaczającym strugę umożliwiła sterowanie położeniem punktu „ładowania” włókien na targecie i ograniczenie amplitudy ruchu wirującej strugi do obszaru poniżej 1cm^2 . Jest to szczególnie ważne przy konstruowaniu różnego typu sond jak i przy planowanym tworzeniem *in-vivo* aktywnych opatrunków opartych na nakładanych na tkankę nanowłóknach.

Modyfikacja procesu zbierania włókien przez wykorzystanie wirującego walca pokrytego folią metalową lub wirującej płaszczyzny wody umożliwiła opracowanie metodyki kontrolowanej produkcji mat zbudowanych z nanowłókien. Maty takie zostały z powodzeniem wykorzystane w badaniach biologicznych.

Odpowiednia modyfikacja składu roztworu polimerowego umożliwiła uzyskanie nanowłókien o zadanej funkcjonalności (przewodzące, fluorescencyjne). Stwierdzono możliwość zbudowania na bazie siatki nanowłókien powierzchniowych sensorów biologicznych (2-D). Pozwoli to na rozszerzenie gammy powszechnie stosowanych w badaniach biologicznych punktowych sensorów typu kropki kwantowe czy cząstki fluorescencyjne o sondy powierzchniowe, reagujące na wielopunktowe pomiary (np. detekcja zmian w kanałach jonowych na powierzchni błony komórkowej).

Spis treści

WPROWADZENIE	1
1 WSTĘP	4
2 STANOWISKO POMIAROWE	6
3 ANALIZA WŁASNOŚCI ELEKTRYCZNYCH WŁÓKIEŃ	12
3.1 MOTYWACJA BADAŃ PRZEPROWADZONYCH NA PRZYKŁADZIE POLI(TLENKU ETYLENU)	12
3.2 CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	14
3.3 NANOWŁÓKNA Z ZAWARTOŚCIĄ POLIMERÓW PRZEWODZĄCYCH	37
4 HODOWLA KULTUR TKANKOWYCH	52
4.1 WPROWADZENIE NANOPOROWATOŚCI DO WŁÓKIEŃ	52
4.2 ELEKTROPRZĘDZENIE BIAŁEK I ZASTOSOWANIE NANOWŁÓKIEŃ JAKO BIOSENSORÓW	55
4.3 NANOWŁÓKNA JAKO BIODEGRADOWALNE POKRYCIE IMPLANTÓW KOSTNYCH	60
4.4 OPTIMALIZACJA TWORZENIA RUSZTOWAŃ Z NANOWŁÓKIEŃ	64
4.5 PRÓBA HODOWLI KOMÓREK NA RUSZTOWANIACH Z NANOWŁÓKIEŃ	70
4.6 HODOWLA LUDZKICH KOMÓREK NA RUSZTOWANIACH Z ELEKTROPRZĘDZONEGO PLLA	72
4.7 HODOWLA LUDZKICH KOMÓREK NA OPTIMALIZOWANYCH RUSZTOWANIACH Z NANOWŁÓKIEŃ	73
4.8 ELEKTROPRZĘDZENIE KOMÓREK	73
5 BADANIA NAD PROCESEM ELEKTROPRZĘDZENIA GLICERYNY	89
5.1 BADANIA ZE STAŁYM WYDATKIEM	89
5.2 BADANIA ZE ZMIENNYM WYDATKIEM	94
6 MODEL NUMERYCZNY PROCESU TWORZENIA SIĘ NANOWŁÓKIEŃ W POLU ELEKTRYCZNYM	96
7 WŁASNOŚCI MECHANICZNE NANOWŁÓKIEŃ	100
7.1 OCENA MIKROSKOPOWA WŁÓKIEŃ POLIMEROWYCH	100
7.2 OCENA WYTRZYMAŁOŚCI MAT POLIMEROWYCH	102
7.3 WYTRZYMAŁOŚĆ POJEDYŃCZYCH NANOWŁÓKIEŃ	107
7.4 PORÓWNANIE WYNIKÓW DLA MAT I POJEDYŃCZYCH WŁÓKIEŃ	110
8 OPTIMALIZACJA WYDAJNOŚCI PROCESU ELEKTROPRZĘDZENIA	112
8.1 ELEKTROPRZĘDZENIE W UKŁADZIE DWUDYSZOWYM	112
8.2 ELEKTROPRZĘDZENIE W UKŁADZIE BEZDYSZOWYM	114
9 OPTIMALIZACJA POLA ELEKTROSTATYCZNEGO	118
9.1 ANALIZOWANE SYSTEMY ELEKTROPRZĘDZENIA NANOWŁÓKIEŃ	118
9.2 OPTIMALIZACJA GEOMETRII UKŁADU ELEKTROD I POLA ELEKTRYCZNEGO	127
9.3 SYMULACJE ROZKŁADU POLA ELEKTRYCZNEGO	129
9.4 WNIOSKI - WPŁYW PARAMETRÓW UKŁADU NA PROCES ELEKTROPRZĘDZENIA	133
10 BADANIA ELEKTROREOLOGICZNE	134
11 WNIOSKI KOŃCOWE	137
SPIS TREŚCI	138
LITERATURA	139

Literatura

- [1] Acatay K., Simsek E., Akel M., Yusuf Z., *Mencelo?Lu Electrospinning Of Low Surface Energy Quaternary Ammonium Salt Containing Polymers And Their Antibacterial Activity W Nanoengineered Nanofibrous Materials*, NATO Series II Mathematics Physics and Chemistry, 169, pp. 97-106.
- [2] Agarwal S., Wendorff J. H., Greiner A., *Use Of Electrospinning Technique For Biomedical Applications*, Polymer (2008), 49, pp. 5603-5621.
- [3] Anzenbacher Jr P., Palacios M. A., *Polymer Nanofibre Junctions Of Attolitre Volume Serve As Zeptomole-Scale Chemical Reactors*, Nature Chemistry (2009), 1.
- [4] Arayanarakul K., Choktaweasap N., Aht-ong D., Meechaisue Ch., Supaphol P., *Effects Of Poly(Ethylene Glycol), Inorganic Salt, Sodium Dodecyl Sulfate, And Solvent System On Electrospinning Of Poly(Ethylene Oxide)*, Macromol. Mater. Eng. (2006), 291, pp. 581-591.
- [5] Badami A. S., Kreke M. R., Thompson M. S., Riffle J. S., c, Goldstein A. S., *Effect Of Fiber Diameter On Spreading, Proliferation, And Differentiation Of Osteoblastic Cells On Electrospun Poly(Lactic Acid) Substrates*, Biomaterials (2006), 27, pp. 596-606.
- [6] Baker S. C., Atkin N., Gunning P. A., Granville N., Wilson K., Wilson D., Southgate J., *Characterisation Of Electrospun Polystyrene Scaffolds For Three-Dimensional In Vitro Biological Studies*, Biomaterials (2006), 27, pp. 3136-3146.
- [7] Banka P. A., Selser J. C., Wang B., Shenoy D. K., Martin R., *Nonionic Polymer-Salt Interactions In Dilute Solution: The Poly(Ethylene Oxide)/Liclo4/Methanol*, System Macromolecules (1996), 29, pp. 3956-3959.
- [8] Bashur C. A., Dahlgren L. A., Goldstein A. S., *Effect Of Fiber Diameter And Orientation On Fibroblast Morphology And Proliferation On Electrospun Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Meshes*, Biomaterials (2006), 27, pp. 5681-5688.
- [9] Berdy D., Chong H., Paruchuri S., Yu J., Hollar K., Weitz D., Stone H., Brenner M., *Bifurcations In Electrospinning: Splitting A Polymer Jet*, Harvard REU (Research Experience for Undergraduates) (2005).
- [10] Bhattarai N., Edmondson D., Veiseh O., Matsen F. A., Zhang M., *Electrospun Chitosan-Based Nanofibers And Their Cellular Compatibility*, Biomaterials (2005), 26, pp. 6176-6184.
- [11] Bini T. B., Gao S., Tan T. C., Wang S., Lim A., Hai L. B., Ramakrishna S., *Electrospun Poly(L-Lactide-Co-Glycolide) Biodegradable Polymer Nanofibre Tubes For Peripheral Nerve Regeneration*, Nanotechnology (2004), 15, pp. 1459-1464.

- [12] Bishop A., Balázsi Cs., Gouma P., *Hydroxyapatite Biocomposite Coatings Prepared By Electrospinning For Advanced Prosthetics*, Proceeding of the 8th Polymers for Advanced Technologies International Symposium, Budapest, Hungary, 13-16 September (2005).
- [13] Blonski S., Blasinska A., Kowalewski T. A., *Electrospinning Of Liquid Jets*, conference proceedings, XXI International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, Warsaw, Poland, 15-21 August 2004.
- [14] Błasińska A., Krucińska I., Chrzanowski M., Domaradzka-Nicińska S., *Manufacturing Biomaterials From Nanometer-Size Fibres Of Dibutyrylchitin Using Electrospinning Method*, Rozdział w monografii Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, Wydawca H. Struszczyk, tom X.
- [15] Boccaccini A. R., Maquet V., *Bioresorbable And Bioactive Polymer/Bioglass (R) Composites With Tailored Pore Structure For Tissue Engineering Applications*, Compos. Sci Technol. (2003), 63, pp. 2417-2429.
- [16] Bolgen N., Menciloglu Y. Z., Acatay K., Vargel I., Piskin E., *In Vitro And In Vivo Degradation Of Non-Woven Materials Made Of Poly(?-Caprolactone) Nanofibers Prepared By Electrospinning Under Different Conditions*, J. Biomater. Sci. Polymer Edn (2005), pp. 1537-1555.
- [17] Bonzani I. C., George J. H., Stevens M. M., *Novel Materials For Bone And Cartilage Regeneration*, Current Opinion in Chemical Biology (2006), 10, pp. 568-575.
- [18] Boudriot U., Dersch R., Greiner A., Wendorff J. H., *Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering—A Brief Overview*, Artif Organs (2006).
- [19] Bowlin G. L., *A New Spin On Scaffolds*, Materials Today (2004), 64.
- [20] Breitenbach A., *Comb Polymers For Biomedical Application Obtained By Grafting Biodegradable Polyester Chains Onto Hydrophilic Polyol Backbones*, Ph.D. Thesis, Philipps-Universität Marburg (2000).
- [21] Bretcanu O., Misra S.K., Yunos D.M., Boccaccini A.R., Roy I., Kowalczyk T., Blonski S., Kowalewski T.A., *Electrospun nanofibrous biodegradable polyester coatings on Bioglass-based glass-ceramics for tissue engineering*, Materials Chemistry and Physics (2009), 118, pp. 420-426.
- [22] Bumsu K., Hyun P., Lee S.-H., Sigmund W. M., *Poly(Acrylic Acid) Nanofibers By Electrospinning*, Materials Letters (2005), 59.
- [23] Buttafoco L., Kolkman N. G., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A. A., Dijkstra P. J., Vermes I., Feijen J., *Electrospinning Of Collagen And Elastin For Tissue Engineering Applications*, Biomaterials (2006), 27, pp. 724-734.
- [24] Chilarski A., Szosland L., Krucinska I., Blasinska A., Cislo R., *Dibutyrylchitin Non-Woven Dressings As Materials Accelerating Wound Healing*, Proceeding of the 8th

- Polymers for Advanced Technologies International Symposium, Budapest, Hungary, 13-16 September 2005.
- [25] Choi J. S., Lee S. W., Jeong L., Bae S.-H., Min B. C., Youk J. H., Park W. H., *Effect Of Organosoluble Salts On The Nanofibrous Structure Of Electrospun Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate)*, International Journal of Biological Macromolecules (2004), 34, pp. 249-256.
- [26] Chua K.-N., Chai Ch., Lee P.-Ch., Tang Y.-N., Ramakrishna S., Leong K. W., Mao H.-Q., *Surface-Aminated Electrospun Nanofibers Enhance Adhesion And Expansion Of Human Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor Cells*, Biomaterials (2006), 27, pp. 6043-6051.
- [27] Coughlin A. J., Queen H. A., McCullen S. D., Krause W. E., *Electrospinning Of Biocompatible Nanofibers*, Meeting of The American Physical Society (2006).
- [28] Courtney T., Sacks M. S., Stankus J., Guan J., Wagner W. R., *Design And Analysis Of Tissue Engineering Scaffolds That Mimic Soft Tissue Mechanical Anisotropy*, Biomaterials (2006), 27, pp. 3631-3638.
- [29] Cui F.-Z., Li Y., Ge J., *Self-Assembly Of Mineralized Collagen Composites*, Materials Science and Engineering (2007), pp. 1-27.
- [30] Dayal P., Kyu T., *Dynamics and morphology development in electrospun fibers driven by concentration sweeps.*, Phys. Fluids (2007), 19, p. 1011061.
- [31] Dayal P., Kyu T., *Dynamics And Morphology Development In Electrospun Fibers Driven By Concentration Sweeps*, Physics of Fluids (2007), 19, pp. 101106, 1-9.
- [32] Desai K., Kit K., Li J., Zivanovic S., *Morphological And Surface Properties Of Electrospun Chitosan Nanofibers*, Biomacromolecules (2008), 9, pp. 1000-1006.
- [33] Dosunmu O. O., Chase G. G., Kataphinan W., Reneker D. H., *Electrospinning Of Polymer Nanofibres From Multiple Jets On A Porous Tubular Surface*, Nanotechnology (2006), 17, pp. 1123-1127.
- [34] Dror Y., Salalha W., Avrahami R., Zussman E., Yarin A. L., Dersch R., Greiner A., Wendorff J. H., *One-Step Production Of Polymeric Microtubes By Coelectrospinning*, Small, pp. 1064-1073.
- [35] Dror Y., Ziv T., Makarov V., Wolf H., Admon A., Zussman E., *Nanofibers Made Of Globular Proteins*, Biomacromolecules (2008), pp. 2749-2754.
- [36] Feng J. J., *Stretching of a straight electrically charged viscoelastic jet.*, J. Non-Newtonian Fluid Mech. (2003).
- [37] Formhals A., *Process And Apparatus For Preparing Artificial Threads*, US Pat. (1934).
- [38] Formhals A., *Method And Apparatus For Spinning*, US Pat. (1944).
- [39] Frey M. W., Li L., *Electrospinning And Porosity Measurements Of Nylon-6/Poly(Ethylene Oxide) Blended Nonwovens*, Journal of Engineered Fibers and Fabrics (2007).

- [40] Fridrikh S. V., Yu J. H., Brenner M. P., Rutledge G. C., *Controlling the fiber diameter during electrospinning.*, Phys. Rev. Lett. (2003), 90, p. 144502.
- [41] Geng X., Kwon O.-H., Jang J., *Electrospinning Of Chitosan Dissolved In Concentrated Acetic Acid Solution*, Biomaterials (2005), 26, pp. 5427-5432.
- [42] Gibson P., Schreuder-Gibson H., *Patterned Electrospun Polymer Fiber Structures*, e-Polymers (2003), pp. 1-15.
- [43] Gilbert William of Colchester (Gvilielmi Gilberti), *De Magnete*, Londini, Anno MDC (1600).
- [44] Greengard L., Rokhlin V., *A fast algorithm for particle simulations.*, J. Comput. Phys. (1987), 73, p. 325.
- [45] Hsu Ch.-M., Shivkumar S., *Nano-Sized Beads And Porous Fiber Constructs Of Poly(?-Caprolactone) Produced By Electrospinning*, Journal of Materials Science (2004), 39, pp. 3003-3013.
- [46] Inoguchi H., K. Kwon I., Inoue E., Takamizawa K., Maehara Y., Matsuda T., *Mechanical Responses Of A Compliant Electrospun Poly(L-Lactide-Co-E-Caprolactone) Small-Diameter Vascular Graft*, Biomaterials (2006), 27, pp. 1470-1478.
- [47] Ito Y., Hasuda H., Kamitakahara M., Ohtsuki C., Tanihara M., Kang I. K., Kwon O. H., *A Composite Of Hydroxyapatite With Electrospun Biodegradable Nanofibers As A Tissue Engineering Material*, J. Biosci Bioeng. (2005), pp. 43-9.
- [48] Janjanin S., Wan-Ju M. D., Li M. T., Morgan R., Shanti M., Tuan R. S., *Mold-Shaped, Nanofiber Scaffold-Based Cartilage Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells And Bioreactor*, Journal of Surgical Research (2008), 149, pp. 47-56.
- [49] Jun Z., Hou H., Schaper A., Wendorff J. H., Greiner A., *Poly-L-Lactide Nanofibers By Electrospinning – Influence Of Solution Viscosity And Electrical Conductivity On Fiber Diameter And Fiber Morphology*, e-Polymers (2003).
- [50] K. Noh H., W. Lee S., Kim Jin-Man, Oh Ju-Eun, Kim Kyung-Hwa, Chong-Pyoung Chung, Soon-Chul Choi, Park W. H., Byung-Moo Min, *Electrospinning Of Chitin Nanofibers: Degradation Behavior And Cellular Response To Normal Human Keratinocytes And Fibroblasts*, Biomaterials (2006), 27, pp. 3934-3944.
- [51] Koombhongse S., Eby R., Jones S., Walker M., Naik R., Wahl K., *Influence Of Green Fluorescent Protein (Gfp) Nanoparticles On The Optical And Mechanical Properties Of Silk In Bio-Nanocomposites With Photonic Properties*, Meeting of The American Physical Society (2006).
- [52] Kowalczyk T., Nowicka A., Elbaum D., Kowalewski T. A., *Electrospinning Of Bovine Serum Albumin. Optimization And The Use For Production Of Biosensors*, Biomacromolecules (2008), 9, pp. 2087-2090.
- [53] Kowalewski T. A., *Wybrane przepływy ze swobodna powierzchnią - strugi i krople*, Prace IPPT PAN Warszawa (1995), 3.

- [54] Kowalewski T. A., *On separation of droplets from a liquid jet*, Fluid Dyn. Res. (1996), p. 121.
- [55] Kowalewski T. A., Barral S., *Modelling Electrospinning of Nanofibres*, PAMM, (w druku) (2009), 9.
- [56] Kowalewski T. A., Barral S., Kowalczyk T., *Modeling Electrospinning of Nanofibers*, in Modelling Nanomaterials and Nanosystems. R. Pyrz, J.C. Rauhe (Eds.), Springer Science+Business Media B.V., IUTAM Bookseries (2009), 13, pp. 279-292.
- [57] Kowalewski T. A., Blonski S., Barral S., *Experiments And Modelling Of Electrospinning Process*, Bull. Pol. Ac. Tech. (2005), pp. 385-394.
- [58] Kowalewski T. A., Yarin A. L., Blonski S., *Nanofibres By Electro-Spinning Of Polymer Solution*, conference proceedings, The 5th Euromech Fluid Mechanics Conference, Toulouse, France, 24-28 August 2003.
- [59] Krucińska I., Komisarczyk A., Chrzanowski M., Gliścińska E., Wrzosek H., *Electrostatic Field In Electrospinning With A Multicapillary Head – Modelling And Experiment*, FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe (2009), pp. 38-44.
- [60] Lal J., Hakem I. F., *Unusual Behaviour Of Poly(Ethylene-Oxide) In Aqueous Mixtures*, Eur. Phys. J. E (2004), 15, pp. 217-223.
- [61] Lee K. H., Kim D. J., Min B. G., Lee S.-H., *Polymeric Nanofiber Web-Based Artificial Renal Microfluidic Chip*, Biomed Microdevices (2007), 9, pp. 435-442.
- [62] Li M., Guo Y., Wei Y., MacDiarmid A. G., Lelkes P. I., *Electrospinning Polyaniline-Contained Gelatin Nanofibers For Tissue Engineering Applications*, Biomaterials (2006), 27, pp. 2705-2715.
- [63] Li M., Mondrinos M. J., R. Gandhia M., K. Ko F., S. Weiss A., I. Lelkes P., *Electrospun Protein Fibers As Matrices For Tissue Engineering*, Biomaterials (2005), 26, pp. 5999-6008.
- [64] Li W.-J., Cooper Jr. J. A., Mauck R. L., Tuan R. S., *Fabrication And Characterization Of Six Electrospun Poly(?-Hydroxy Ester)-Based Fibrous Scaffolds For Tissue Engineering Applications*, Acta Biomaterialia (2006), pp. 377-385.
- [65] Li X., Feng Q., Liu X., Dong W., Cui F., *Collagen-Based Implants Reinforced By Chitin Fibres In A Goat Shank Bone Defect Model*, Biomaterials (2006), 27, pp. 1917-1923.
- [66] Liang D., S. Hsiao B., Chu B., *Functional Electrospun Nanofibrous Scaffolds For Biomedical Applications*, Advanced Drug Delivery Reviews (2007), 59, pp. 1392-1412.
- [67] Lin T., Wang H., Wang H., Wang X., *The Charge Effect Of Cationic Surfactants On The Elimination Of Fibre Beads In The Electrospinning Of Polystyrene*, Nanotechnology (2004), 15, pp. 1375-1381.
- [68] Liu K. J., Anderson J. E., *Nuclear Magnetic Relaxation In Poly(Ethylene Oxide)-Salt Solution*, Macromolecules (1969), 2, pp. 235.

- [69] Liu Y., He J. H., *Bubble Electrospinning For Mass Production Of Nanofibers*, International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation (2007), pp. 393-396.
- [70] Luong-Van E., Grondahl L., N. Chua K., W. Leong K., Nurcombe V., M. Cool S., *Controlled Release Of Heparin From Poly(E-Caprolactone) Electrospun Fibers*, Biomaterials (2006), 27, pp. 2042-2050.
- [71] Luu Y. K., Kim K., Hsiao B. S., Chu B., Hadjiargyrou M., *Development Of Nanostructured Dna Delivery Scaffold Via Electrospinning Of Plga And Pla-Peg Block Copolymers*, J. Control Release (2003), 89, pp. 341-353.
- [72] Ma M., Hill R. M., *Superhydrophobic Surfaces*, Current Opinion in Colloid & Interface Science (2006), 11, pp. 193-202.
- [73] Minier C., Moore M. N., *Rhodamine B Accumulation And Mxr Protein Expression In Mussel Blood Cells: Effects Of Exposure To Vincristine*, Mar. Ecol. Prog. Ser. (1996), 142, pp. 165-173.
- [74] Moroni L., Schotel R., Sohier J., de Wijn J. R., van Blitterswijk C. A., *Polymer Hollow Fiber Three-Dimensional Matrices With Controllable Cavity And Shell Thickness*, Biomaterials (2006), 27, pp. 5918-5926.
- [75] Munir M. M., Iskandar F., Khairurrijal, Okuyama K., *High Performance Electrospinning System For Fabricating Highly Uniform Polymer Nanofibers*, Review of Scientific Instruments (2009), 80, pp. 26106, 1-3.
- [76] Nikolova M., Savova I., Marinov M., *An Optimised Method For Investigation Of The Yeast Viability By Means Of Fluorescent Microscopy*.
- [77] Ohkawa K., Kim H., Lee K., *Biodegradation Of Electrospun Poly(E Caprolactone) Non-Woven Fabrics By Pure-Cultured Soil Filamentous Fungi*, Journal of Polymers and the Environment (2004), pp. 211-218.
- [78] Oliveira M. S. N., Yeh R., McKinley G. H., *Iterated Stretching, Extensional Rheology And Formation Of Beads-On-A-String Structures In Polymer Solutions*, J. Non-Newtonian Fluid Mech. (2006), 137, pp. 137-148.
- [79] Ono K., Konami H., Murakami K. J., *Conductometric Studies Of Ion Binding To Poly(Oxyethylene Oxide) In Methanol*, Phys. Chem. (1979), 83, pp. 2665.
- [80] Onori J., Pang K., Kotek R., *Dissolution Of Cellulose Ncsu Agep*, 4-th Annular Undergrad Summer Research Symposium, 5 August 2005.
- [81] P. S. Tan E., Y. Ng S., T. Lim C., *Tensile Testing Of A Single Ultrafine Polymeric Fiber*, Biomaterials (2005), 26, pp. 1453-1456.
- [82] Pan H., Jiang H., Chen W., *Interaction Of Dermal Fibroblasts With Electrospun Composite Polymer Scaffolds Prepared From Dextran And Poly Lactide-Co-Glycolide*, Biomaterials (2006), 27, pp. 3209-3220.
- [83] Pouneva I., *Evaluation Of Algal Culture Viability And Physiological State By Fluorescent Microscopic Methods*, Bulg. J. Plant Physiol. (1997), pp. 67-76.

- [84] Pradny M., Martinova L., Michalek J., Fenclova T., Krumbholcova E., *Electrospinning Of The Hydrophilic Poly (2-Hydroxyethyl Methacrylate) And Its Copolymers With 2-Ethoxyethyl Methacrylate*, Central European Journal of Chemistry (2007), pp. 779-792.
- [85] Qi H., Hu P., Xu J., Wang A., *Encapsulation Of Drug Reservoirs In Fibers By Emulsion Electrospinning: Morphology Characterization And Preliminary Release Assessment*, Biomacromolecules (2006), 7, pp. 2327-2330.
- [86] R. Kenawy E., M. Layman J., R. Watkins J., L. Bowlin G., A. Matthews J., G. Simpson D., E. Wnek G., *Electrospinning Of Poly(Ethylene-Co-Vinyl Alcohol) Fibers*, Biomaterials (2003), 24, pp. 907-913.
- [87] Rayleigh, Lord, *Theory of sound*, London, Macmillan (1894).
- [88] Ren G., Xu X., Liu Q., Cheng J., Yuan X., Wu L., Wan Y., *Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Glucose Oxidase Biocomposite Membranes For Biosensor Applications*, Reactive & Functional Polymers (2006), 66, pp. 1559-1564.
- [89] Reneker D. H., Chun I., *Nanometre Diameter Fibres Of Polymer, Produced By Electrospinning*, Nanotechnology (1996), 7, pp. 216-223.
- [90] Reneker D. H., Kataphinan W., Theron A., Zussman E., Yarin A. L., *Nanofiber Garlands Of Polycaprolactone By Electrospinning*, Polymer (2002), 43, pp. 6785-6794.
- [91] Rho K. S., Jeong L., Lee G., Seo B.-M., Park Y. J., Hong S.-D., Roh S., Cho J. J., Park W. H., Min B.-M., *Electrospinning Of Collagen Nanofibers: Effects On The Behavior Of Normal Human Keratinocytes And Early-Stage Wound Healing*, Biomaterials (2006), 27, pp. 1452-1461.
- [92] Rocker T., Greiner A., *Electrospinning Of Poly-L-Lactide Nanofibers On Liquid Reservoir Collectors*, e-Polymers (2008).
- [93] Sawicka K. M., Roemer E. J., Simon S. R., *Enzyme Composite Nanofibers As Novel Transdermal Delivery Coating*, Bioengineering Conference. NEBC '07. IEEE 33rd Annual Northeast (2007).
- [94] Schnurer J., Rosswall T., *Fluorescein Diacetate Hydrolysis As A Measure Of Total Microbial Activity In Soil And Litter*, Appl Environ Microbiol. (1982), pp. 1256-1261.
- [95] Son W. K., Youk J. H., Lee T. S., Park W. H., *Effect Of Ph On Electrospinning Of Poly(Vinyl Alcohol)*, Materials Letters (2005), 59, pp. 1571-1575.
- [96] Stankus J. J., Guan J., Fujimoto K., Wagner W. R., *Microintegrating Smooth Muscle Cells Into A Biodegradable, Elastomeric Fiber Matrix*, Biomaterials (2006), 27, pp. 735-744.
- [97] Stitzel J., Liu J., Lee S. J., Komura M., Berry J., Soker S., Lim G., Van Dyke M., Czerw R., Yoo J. J., Atala A., *Controlled Fabrication Of A Biological Vascular Substitute*, Biomaterials (2006), 27, pp. 1088-1094.

- [98] Suwanton O., Waleetorncheepsawat S., Sanchavanakit N., Pavasant P., Cheepsunthorn P., Bunaprasert T., Supaphol P., *In Vitro Biocompatibility Of Electrospun Poly(3-Hydroxybutyrate) And Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) Fiber Mats*, International Journal of Biological Macromolecules (2007), 40, pp. 217-223.
- [99] Taylor G. I., Proc. Roy. Soc. London (1964), p. 383.
- [100] Tripatanasuwan S., Zhong Z., Reneker D. H., *Effect Of Evaporation And Solidification Of The Charged Jet In Electrospinning Of Poly(Ethylene Oxide) Aqueous Solution*, Polymer (2007), 48, pp. 5742-5746.
- [101] Tuzlakoglu K., *Fiber-Based Structures From Natural Origin Polymers For Tissue Engineering Approches*, Ph.D. Thesis, Universidade do Minho (2007).
- [102] Tuzlakoglu K., Bolgen N., Salgado A. J., Gomes M. E., Piskin E., Reis R. L., *Nano-And Micro-Fiber Combined Scaffolds: A New Architecture For Bone Tissue Engineering*, Journal of Materials Science, Materials in Medicine (2005), 16, pp. 1099-1104.
- [103] Venugopal J. R., Zhang Y., Ramakrishna S., *In Vitro Culture Of Human Dermal Fibroblasts On Electrospun Polycaprolactone Collagen Nanofibrous Membrane*, Artif Organs (2006).
- [104] Woo K. M., Jun J.-H., Chen V. J., Seo J., Baek J.-H., Ryoo H.-M., Kim G.-S., Somerman M. J., Ma P. X., *Nano-Fibrous Scaffolding Promotes Osteoblast Differentiation And Biomineralization*, Biomaterials (2007), 28, pp. 335-343.
- [105] Wu Y., Carnell L. A., Clark R. L., *Control Of Electrospun Mat Width Through The Use Of Parallel Auxiliary Electrodes*, Polymer (2007), 48, pp. 5653-5661.
- [106] Wutticharoenmongkol P., Sanchavanakit N., Pavasant P., Supaphol P., *Novel Bone Scaffolds Of Electrospun Polycaprolactone Fibers Filled With Nanoparticles*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology (2006), 6, pp. 514-522.
- [107] Wutticharoenmongkol P., Supaphol P., Sriksirin T., Kerdcharoen T., Osotchan T., *Electrospinning Of Polystyrene/Poly(2-Methoxy-5-(2'-Ethylhexyloxy)-1,4-Phenylene Vinylene) Blends*, Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics (2005), 43, pp. 1881-1891.
- [108] Xie J., Hsieh Y.-L., *Ultra-High Surface Fibrous Membranes From Electrospinning Of Natural Proteins: Casein And Lipase Enzyme*, Journal of Materials Science (2003), 38, pp. 2125-2133.
- [109] Yarin A., *Electrospinning Of Nanofibers From Polymer Solutions And Melts*, IPPT PAN and CoE AMAS, Warsaw, Lecture Notes (2003), 5.
- [110] Yarin A. L., *Free liquid jets and films: hydrodynamics and rheology*, Longman Scientific & Technical (1993).
- [111] Yee W. A., Kotaki M., Liu Y., Lu X., *Morphology, Polymorphism Behavior And Molecular Orientation Of Electrospun Poly(Vinylidene Fluoride) Fibers*, Polymer (2007), 48, pp. 512-521.

- [112] Yokoyama H., Danjo T., Ogawa K., Wakabayashi H., *A Vital Staining Technique With Fluorescein Diacetate (Fda) And Propidium Iodide (Pi) For The Determination Of Viability Of Myxosporean And Actinosporean Spores*, Journal of Fish Diseases (1997), 20, pp. 281-286.
- [113] Young D., Queen H., Krause W., *Fabrication Of Biopolymer Nanofibers Of Hyaluronic Acid Via Electrospinning*, Meeting of The American Physical Society (2006).
- [114] Zeng J., Xu X., Chen X., Liang Q., Bian X., Yang L., Jing X., *Biodegradable Electrospun Fibers For Drug Delivery*, Journal of Controlled Release (2003), 92, pp. 227-231.
- [115] Zhang D., Chang J., *Patterning Of Electrospun Fibers Using Electroconductive Templates*, Adv. Mater. (2007), 19, pp. 3664-3667.
- [116] Zhao Q., Xin Y., Huang Z., Liu S., Yang C., Li Y., *Using Poly[2-Methoxy-5-(20-Ethyl-Hexyloxy)-1,4-Phenylene Vinylene] As Shell To Fabricate The Highly Fluorescent Nanofibers By Coaxial Electrospinning*, Polymer (2007), 48, pp. 4311-4315.
- [117] Zhou Y., Yang D., Chen X., Xu Q., Lu F., Nie J., *Electrospun Water-Soluble Carboxyethyl Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Nanofibrous Membrane As Potential Wound Dressing For Skin Regeneration*, Biomacromolecules (2008), 9, pp. 349-354.
- [118] Zhu Y., Leong M. F., Ong W. F., Chan-Park M. B., Chian K. S., *Esophageal Epithelium Regeneration On Fibronectin Grafted Poly(L-Lactide-Co-Caprolactone) (Pllc) Nanofiber Scaffold*, Biomaterials (2007), 28, pp. 861-868.
- [119] Zong X., Kim K., Fang D., Ran S., Hsiao B. S., Chu B., *Structure And Process Relationship Of Electrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes*, Polymer (2002), 43, pp. 4403-4412.
- [120] www.chimge.unil.ch.
- [121] www.eeescience.utoledo.edu; *Fluorescein Diacetate Hydrolysis Assay*, Laboratory for Microbial Ecology, Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences University of Toledo (2004), 12.
- [122] www.wikipedia.org.
- [123] www.chem.ucalgary.ca.
- [124] www.femm.info.
- [125] www.glymes.com.
- [126] www.hovo.com; *Nanofibre Web Developed For Automotive Industry, Filtration+Separation* (2005), 13.
- [127] www.cabri.org/guidelines/plant/405.html; *CABRI Common Access To Biological Resources And Information*.