

Katarzyna KOSOWSKA, Marek HENCZKA

e-mail: k.tarabasz@ichip.pw.edu.pl

Zakład Inżynierii i Dynamiki Reaktorów Chemicznych, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Badanie użyteczności do zastosowań w inżynierii biomedycznej kompozytowych pian stałych wytworzonych metodą spieniania przy użyciu płynów w stanie nadkrytycznym

Wstęp

W ciągu ostatnich lat nastąpił znaczny rozwój w dziedzinie wytwarzania funkcjonalnych struktur porowatych o dużej wartości rynkowej i użyteczności. W literaturze opisywanych jest wiele tradycyjnych sposobów produkcji pian stałych [Thomas i in., 2009], jednak istotną rolę wśród nich spełniają technologie wykorzystujące płyny w stanie nadkrytycznym. Obiecującym sposobem wytwarzania porowatych pian stałych jest wykorzystanie procesu spieniania materiałów przy użyciu płynów w stanie nadkrytycznym, który polega na stopieniu i nasyceniu materiału płynem w stanie nadkrytycznym i następnie dekompresji mieszaniny, co powoduje powstawanie i wzrost gazowych obszarów wewnątrz powstającej struktury.

Struktury porowate wykorzystywane do zastosowań biomedycznych powinny się charakteryzować takimi cechami jak: odpowiedni rozmiar porów, duża porowatość, odpowiednie właściwości mechaniczne, biodegradowalność oraz właściwy czas degradacji zbliżony do czasu regeneracji tkanek, a także biokompatybilność [Karimi i in., 2012; Tayton i in. 2012].

Charakterystyka uzyskanych struktur jest uzależniona od wielu czynników m.in. stosowanej metody wytwarzania oraz wykorzystywanego rodzaju materiału. Wśród różnorodnych związków chemicznych zastosowanie znalazły takie substancje jak: polimery, metale, bioszklą czy materiały ceramiczne [White i in., 2012]. Stosowanie mieszanin wyżej wymienionych substancji pozwala na uzyskanie kompozytowych struktur o nowych właściwościach, lepiej dostosowanych do potrzeb medycznych.

Przedmiotem niniejszej pracy było zbadanie użyteczności funkcjonalnych kompozytowych pian stałych wytworzonych metodą spieniania przy użyciu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. W ramach pracy dokonano identyfikacji mechanizmów i charakterystyki procesu spieniania poprzez wykonanie jakościowej i ilościowej analizy wytworzonych pian stałych pod względem ich morfologii, właściwości mechanicznych i termicznych oraz cytotoxyczności umożliwiającej zastosowanie ich do celów biomedycznych jako biodegradowalne rusztowania do hodowli komórek kostnych.

Badania doświadczalne

Materiały. Materiałem poddawanym procesowi spieniania był kompozyt wytworzony z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego poli(ϵ -caprolaktonu) w formie granulek ($D = 3$ mm) o masie $M_n = 80\ 000$ oraz hydroksyapatytu w postaci proszku ($D \approx 6$ μ m) firmy *Sigma-Aldrich* (Włochy). Czynnikiem rozdmuchującym materiał był ditlenek węgla o czystości 4,5 firmy *Linde Gaz* (Polska). Wytworzenie materiałów kompozytowych z poli(ϵ -kaprolaktonu) wzbogaconego cząstkami czynnika porotwórczego stosowanego w trzech różnych stężeniach (5, 12 i 20 % mas.) było pierwszym etapem badań doświadczalnych. Następnie przeprowadzono spienianie przygotowanych materiałów z wykorzystaniem wysokociśnieniowej instalacji badawczej.

Proces wytwarzania kompozytowych struktur porowatych był realizowany w sposób okresowy w trzech następujących etapach: w pierwszej fazie dokonano topienia materiału i jego nasycania czynnikiem spieniającym jakim jest ditlenek węgla z zastosowaniem odpowiednich warunków prowadzenia procesu, następnie przeprowadzono właściwy proces spieniania i ostatecznie dokonano rozprężenia mieszaniny, czemu towarzyszyło tworzenie i wzrost gazowych pęcherzy w strukturze piany stałej.

Zakres badań. Badania eksperymentalne przeprowadzono dla zakresu zmienności parametrów operacyjnych: temperatura: $50 \div 100$ °C, ciśnienia $9 \div 18$ MPa, czasu nasycania $1 \div 6$ h.

Aparatura i metodyka. Analiza właściwości otrzymanych struktur porowatych z wykorzystaniem specjalistycznych metod analitycznych stanowiła istotną część badań doświadczalnych. W celu wykonania ilościowej i jakościowej analizy umożliwiającej przedstawienie istotnych parametrów w kontekście zastosowań w inżynierii biomedycznej wykorzystano takie metody badań jak skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), mikrotomografia komputerowa (μ -CT), skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), statyczna próba ściskania oraz podstawowe badania biologiczne cytotoxyczności materiału z wykorzystaniem standardowej procedury testu MTT.

Topografię piany oraz morfologię przekroju poprzecznego i powierzchni bocznej otrzymanych kompozytowych struktur porowatych wytworzonych w różnych warunkach realizacji procesu spieniania analizowano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego SEM firmy *Phenom* oraz mikrotomografu komputerowego μ -CT firmy *Bruker*.

W kolejnym etapie badań do oceny cech użytkowych funkcjonalnych kompozytowych struktur porowatych wykorzystano analizę termiczną oraz badanie właściwości mechanicznych poprzez zastosowanie skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) oraz statycznej próby ściskania. Analiza termiczna została przeprowadzona w atmosferze argonu, którego przepływ wynosił 50 ml/min z szybkością ogrzewania $10^\circ\text{C}/\text{min}$ w zakresie $25\text{-}120$ °C.

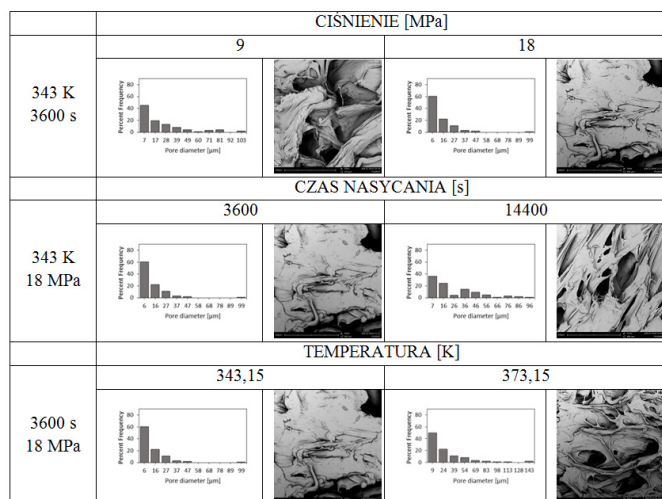
Ocena właściwości mechanicznych była przeprowadzona z wykorzystaniem specjalnie przygotowanych prostopadłościennych próbek struktur porowatych o wymiarach $5 \times 5 \times 8$ mm na uniwersalnej zrywarce firmy *Instron*. Struktury porowate były ściskane do uzyskania 70 % odkształcenia z szybkością 0,4 mm/min w pięciu powtórzeniach. Następnie wyznaczono wartości maksymalnej wytrzymałości oraz modułu *Younga*.

Cytotoxyczność uzyskanych rusztowań kompozytowych identyfikowano przy użyciu testu MTT zgodnie z metodą opisaną w normie [ISO10993-5, 000] polegającą na określeniu cytotoxyczności metodą badania ekstraktów po inkubacji biomateriałów w pożywce. Zgodnie z normą za materiał wykazujący właściwości toksyczne należy uznać próbkę, w której żywotność komórek jest mniejsza niż 70 %.

Zastosowane metody badań umożliwiły analizę przebiegu procesu spieniania kompozytowych materiałów przy użyciu płynów w stanie nadkrytycznym oraz wykazały zasadność wykonania badań nad możliwością wykorzystania tych materiałów w kontekście pożądanых właściwości uzyskanych struktur do zastosowania jako tymczasowe rusztowania do hodowli komórek kostnych.

Wyniki i dyskusja

Analiza morfologii pian. Na rys. 1. przedstawiono zdjęcia mikroskopowe przekroju poprzecznego oraz rozkład wielkości porów wyznaczony z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania do obróbki zdjęć ze skaningowego mikroskopu elektronowego SEM dla pian stałych z 5% zawartością hydroksyapatytu uzyskanych w wyniku pienia w najbardziej skrajnych w badanym zakresie warunkach prowadzenia procesu. Na podstawie analizy morfologii pian stałych dokonano oceny cech jakościowych i ilościowych otrzymanych próbek pian stałych. Stwierdzono istotny wpływ oddziaływania parametrów realizacji procesu spieniania na



Rys. 1. Analiza morfologii pian stałych

właściwości użytkowe struktur porowatych. Analizowane piany stałe wytworzone w warunkach najdłuższego czasu nasycania materiału kompozytowego ditlenkiem węgla charakteryzowały się dużą niejednorodnością struktury. Ponadto zaobserwowano zwiększenie jednorodności struktury pod wpływem zwiększającego się ciśnienia procesu.

Na podstawie porównania uzyskanych profili cieplnych dostrzeżono znaczący wpływ parametrów prowadzenia procesu spieniania na temperaturę topnienia badanych materiałów. Pod wpływem oddziaływania ditlenku węgla zaobserwowano wzrost wartości temperatury topnienia spienionych materiałów w odniesieniu do surowego granulatu poli(ϵ -caprolaktonu).

Stopień krystaliczności otrzymanych próbek pian stałych wyznaczono z wykorzystaniem zależności będącej stosunkiem entalpii topnienia badanej próbki i iloczynu entalpii topnienia 100 % krystalicznej postaci polimeru z ułamkiem frakcyjnym polimeru w próbce. Stopień krystaliczności struktur został wyznaczony z wykorzystaniem wartości ciepła topnienia dla superkrystalicznego polimeru będącego bazą wykorzystywanych materiałów kompozytowych – poli(ϵ -caprolaktonu). Entalpia topnienia polimeru całkowicie krystalicznego wynosi 142 J/g [Diaz-Gomez i in., 2016].

Analiza termiczna oraz statyczna próba ściskania. Na podstawie otrzymanych wyników z przeprowadzonej analizy termicznej oraz badania właściwości wytrzymałościowych (Tab. 1) dostrzeżono istotny wpływ zmian warunków realizacji procesu wytwarzania pian stałych oraz stężenia czynnika porotwórczego na wartości takich parametrów, jak stopień krystaliczności, temperatura topnienia piany stałej oraz moduł Younga i wytrzymałość mechaniczna. Ogólnie zwiększanie stężenia hydroksyapatytu prowadzi do obniżenia wartości modułu Younga oraz temperatury topnienia struktury porowatej. Prowadzenie eksperymentu w warunkach podwyższonej temperatury umożliwia wytworzenie pian stałych o małej wartości modułu Younga oraz relatywnie niskiej temperaturze topnienia, natomiast podwyższenie ciśnienia prowadzi do obniżenia wartości modułu Younga i wzrostu temperatury topnienia materiału.

Toksyczne oddziaływanie badanych materiałów nie zostało zaobserwowane podczas przeprowadzonych badań. Wartości przeżywalności komórek zawierały się w zakresie dopuszczalnym do zastosowania tych struktur jako biodegradowalne rusztowania do hodowli komórek kostnych.

Podsumowanie i wnioski

W pracy przedstawiono wyniki przeprowadzonych badań doświadczalnych procesu spieniania materiałów kompozytowych z poli(ϵ -kaprolaktonu) wzbogaconego cząstkami porotwórczego hydroksyapatytu przy użyciu ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Szczególną uwagę zwrócono na możliwość zastosowania metody spieniania polimerów przy użyciu płynów w stanie nadkrytycznym do wytwarzania kompozytowych struktur porowatych użytecznych w biomedycynie oraz

Tab. 1. Wyniki przeprowadzonej analizy termicznej i badania właściwości mechanicznych

HA % mas.	Parametr	Analiza termiczna DSC		Statyczna próba ściskania		
		Temperatura topnienia [K]	Stopień krystaliczności [%]	Moduł Younga [MPa]	Wytrzymałość mechaniczna [MPa]	
Temperatura = 343 K, Czas = 3600 s						
5	Ciśnienie, [MPa]	9	334,70	69,99	8,67±0,76	1,17±0,07
		13	335,94	81,59	7,28±0,71	1,70±0,14
		18	336,74	85,25	7,10±0,96	7,44±1,01
12	Ciśnienie, [MPa]	9	334,08	75,77	5,20±1,03	2,40±0,88
		13	334,65	76,22	2,68±0,33	0,87±0,03
20	Ciśnienie, [MPa]	18	335,57	72,77	4,63±0,65	2,05±0,50
		9	334,64	81,22	5,75±0,35	0,94±0,03
		13	332,71	74,03	3,76±0,61	0,89±0,03
20	Ciśnienie, [MPa]	18	333,32	81,62	5,01±0,84	1,054±0,17
		9	334,64	81,22	5,75±0,35	0,94±0,03
		13	332,71	74,03	3,76±0,61	0,89±0,03
Ciśnienie = 18 MPa, Czas = 3600 s						
5	Temperatura, [oC]	50	336,85	73,25	4,67±1,35	17,99±5,22
		70	336,74	85,25	7,10±0,96	7,44±1,01
		100	335,33	63,25	1,84±0,10	1,09±0,21
12	Temperatura, [oC]	50	334,91	82,42	4,40±0,84	1,76±0,41
		70	335,57	72,77	4,63±0,65	2,05±0,50
		100	331,57	69,28	2,78±0,24	1,52±0,08
20	Temperatura, [oC]	50	335,66	75,68	1,74±0,32	0,61±0,08
		70	334,60	73,56	5,01±0,84	1,05±0,17
		100	335,60	80,11	2,44±0,61	0,74±0,10

określono wpływ temperatury, ciśnienia i czasu nasycania materiału ditlenkiem węgla na właściwości wytwarzanych pian stałych. Na podstawie wykonanych zdjęć mikroskopowych SEM oraz zdjęć z mikrotomografu komputerowego dokonano analizy ilościowych i jakościowych właściwości otrzymanych kompozytowych produktów, co umożliwiło określenie silnego wpływu zmian warunków prowadzenia procesu spieniania na cechy otrzymanych struktur porowatych. Na podstawie przeprowadzonych badań doświadczalnych określono wpływ sposobu realizacji procesu i parametrów operacyjnych oraz stężenia czynników porotwórczych na morfologię i właściwości mechaniczne wytworzonych porowatych struktur.

Wykorzystanie analizy termicznej oraz badań dotyczących oceny właściwości mechanicznych z zastosowaniem statycznej próby ściskania umożliwiło określenie w badanym zakresie zmienności parametrów operacyjnych braku negatywnego wpływu zmian warunków realizacji procesu spieniania materiałów na charakterystykę otrzymanych rusztowań. Ponadto wykazano iż wytworzone struktury porowate nie wykazują toksycznego oddziaływania na hodowane komórki oraz charakteryzują się właściwościami spełniającymi wymagania medycyny regeneracyjnej, co umożliwia ich zastosowanie w inżynierii tkankowej.

LITERATURA

Diaz-Gomez L., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Garcia-González C. A., (2016). Growth factors delivery from hybrid PCL-starch scaffolds processed using supercritical fluid technology. *Carbohydrate Polymers* 142, 282-292. DOI: 0.1016/j.carbpol.2016.01.051

Karimi M., Heuchel M., Weigel T., Schossig M., Hofmann D., Lendlein, A., (2012). Formation and size distribution of pores in poly(ϵ -caprolactone) foams prepared by pressure quenching using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*, 61, 175-190. DOI: 10.1016/j.supflu.2011.09.022

Tayton E., Purcell M., Aarvold A., Smith J.O., Kalra S., Briscoe A., ... & Oreffo, R.O.C., (2012). Supercritical CO₂ fluid-foaming of polymers to increase porosity: a method to improve the mechanical and biocompatibility characteristics for use as a potential alternative to allografts in impaction bone grafting? *Acta Biomater.*, 8, 1918-1927. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.01.024

Thomas S., Yang W. (Eds), (2009). *Advances in polymer processing: from macro to nano-scales*. Woodhead Publ.Ltd and CRC Press LLC, Elsevier

White L. J., Hutter V., Tai H., Howdle S.M., Shakesheff K.M., (2012). The effect of processing variables on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater.*, 8, 61-71. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.07.032