

Mladi za napredek Maribora 2013

30. srečanje

BIORAZGRADLJIVI POLIMERI NA OSNOVI ŠKROBA IN NJIHOVA UPORABA V MEDICINI

PODROČJE: ZDRAVSTVO IN VETERINA

INOVACIJSKI PREDLOG

CE d | KÖXCÖÁ UPUÜQ
T ^} d | KZÖÖP SOZSÒWÔ
¥[| KQZÖQ P OZBOÁ CEJÓUÜ

Maribor, februar 2013

Mladi za napredek Maribora 2013

30. srečanje

BIORAZGRADLJIVI POLIMERI NA OSNOVI ŠKROBA IN NJIHOVA UPORABA V MEDICINI

PODROČJE: ZDRAVSTVO IN VETERINA

INOVACIJSKI PREDLOG

Maribor, februar 2013

Kazalo vsebine

POVZETEK	5
ZAHVALA.....	5
1 UVOD.....	6
1.1 Cilj inovacijskega predloga.....	7
1.2 Hipoteze	7
2 TEORETIČNO OZADJE.....	8
2.1 Kaj so polimeri?	8
2.2 Biorazgradljivi polimeri.....	10
2.2.1 Proces razgradnje biopolimera	11
2.3 Neželeni učinki biorazgradnje polimerov.....	14
2.4 Škrob.....	14
2.4.1 Hidroliza škroba v telesu	15
2.5 Lastnosti in uporaba biorazgradljivih materialov v medicini.....	15
2.6 Sinteza biopolimerov	17
2.7 Termoplastični škrobni polimer	17
3 UPORABA BIORAZGRADLJIVE PLASTIKE PRI ČIŠČENJU MLEČNIH ZOB.....	18
4 PRAKTIČNI DEL	20
I. del.....	20
4.1 Sinteza biopolimera na osnovi škroba in izbira polimera, ki ima najboljše lastnosti za izdelavo držala zobne ščetke	20
4.1.2 Rezultati	21
4.2 Sinteza termoplastičnih polimerov na osnovi koruznega škroba z dodanimi živilskimi barvili.....	22
4.1.2 Rezultati poskusov z različni živilskimi barvili	24
5.1 LASTNOSTI SINTETIZIRANIH POLIMEROV	25
5.2 Kemijska odpornost sintetiziranih polimerov (topnost pri različnih vrednostih pH)	25
5.2.1 Rezultati poskusa	26
5.3 Sinteza termoplastičnega polimer tipa KŠ1_G z dodano acetilsalicilno kislino.....	28
5.3.1 Rezultati	29
5.4 Natezna trdnost, gostota, gorenje, in pH termoplastičnih polimerov KŠ1-G(ASA)	30
5.4.1 Rezultati poskusov	32
5.5 Topnost ČŠ-G(ASA), KŠ1-G(ASA), pektin-glicerol (ASA) polimerov v različnih topilih	32
5.5.1 Rezultati meritev (po 60 min).....	33

6– BIOPOLIMER KOT NOSILEC TERAPEVTSKE UČINKOVINE	34
6.1 Biopolimer kot nosilec terapevtske učinkovine (primer aspirina).....	34
6.1.1 Izhodišče za pripravo poskusa.....	34
6.2 Hidroliza polimera z oznako KŠ1 –G z vključenim Aspirinom®	37
6.3 Meritev stopnje hidrolize polimera z vključenim Aspirinom®	38
6.4 Delež Aspirina®, ki se je hidroliziral v biopolimeru	39
6.5 Izračun deleža Aspirina, ki se je hidroliziral (sprostil iz polimerne osnove), pH=7.....	40
6.6 Hitrost hidrolize pri pH=1	41
6.7 Izračun deleža Aspirina, ki se je hidroliziral (sprostil iz polimerne osnove), pH=1.....	43
6.8 Stopnja hidrolize Aspirina pri pH=7	44
6.9 Stopnja hidrolize Aspirina pri pH=1	45
7 RAZPRAVA	46
1. del poskusov.....	46
2. del poskusov – lastnosti sintetiziranih polimerov	47
3. del – biopolimeri kot nosilci terapevtske učinkovine.....	48
8 ZAKLJUČKI	49
9 VIRI IN LITERATURA	52

Kazalo slik

Slika 1: Zgradba škroba (Dolenc, 2010, str. 179).....	14
Slika 2: Zgradba amilozen (Avérous, L., Pollet, E., 2012)	15
Slika 3: Vijaki (levo) in ploščice (desno) iz biorazgradljivih polimerov za fiksacijo kosti (Cergol, 2011)..	16
Slika 4: Prikaz upogibne trdnosti, kjer je F-sila, A in B podpori, L- celotna dolžina, X- razdalja od podpore do točke delovanja sile in M- velikost navora (Avsec, 2011, str. 26).....	31
Slika 5: Prirejen poskus upogibne trdnosti	31
Slika 6: Povečanje volumna KŠ1-G(ASA) v destilirani vodi (desno) in primerjava z acetonom (levo)....	33
Slika 7: Zvezdica termoplastičnega polimera na osnovi pektina z dodanim Aspirinom®.	50

Kazalo organigramov

Organigram 1: Razgradnja biopolimera	12
Organigram 2: Predstavitev sinteze biopolimera.....	20

Organigram 3: Prikaz spremljanja sproščanja aspirina iz biopolimera pri pH=7 in pH=1 34

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Odvisnost lastnosti polimerov od njihove zgradbe (Kornhauser, 1996, str. 97) 9

Preglednica 2: Sinteza biopolimerov primernih za držala zobnih ščetk (sušeno v sušilniku na 50°C, 24 ur) 21

Preglednica 3: Uporaba različnih živilskih barvil pri sintezi biopolimera 24

Preglednica 4: Vpliv različnih pigmentov na strukturo polimera KŠ1-G po 10 min izpostavljanja različnim pH okoljem 26

Preglednica 5: Vpliv različnih pigmentov na strukturo polimera KŠ1-G po 24 urni izpostavljanja različnim pH okoljem 27

Preglednica 6: Izguba vode med sušenjem polimerov KŠ1-G(ASA) in KŠ2-G(ASA) 29

Preglednica 7: Izguba mase vode pri uporabi čistega škroba (Sigma Aldich) in nadomestilu za škrob – jabolčnemu pektinu. 30

Preglednica 8: Testiranje upogibne trdnosti, gostote, gorljivosti in pH vodnih raztopin po 60 min namakanja v destilirani vodi. 32

Preglednica 9: Obnašanje izbranih polimerov z vgrajenim Aspirinom v različnih topilih 33

Preglednica 10: Priprava standardnih raztopin – c_0 35

Preglednica 11: Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo 36

Preglednica 12: Meritve absorbance standardnih raztopin 36

Preglednica 13: Podatki o hidrolizi polimera z oznako KŠ1- G(ASA) po 5 min 37

Preglednica 14: Spreminjanje absorbance v času 48 ur (hidroliza biopolimera z vključenim Aspirinom) 38

Preglednica 15: Izračun salicilne kisline, ki je nastala kot produkt hidrolize Aspirina po 5 min, 24 urah, 48 urah 39

Preglednica 16: Delež hidroliziranega Aspirina pri pH=7 41

Preglednica 17: Spreminjanje absorbance v času 48 ur (hidroliza biopolimera z vključenim Aspirinom), pH=1 41

Preglednica 18: Izračun salicilne kisline, ki je nastala kot produkt hidrolize Aspirina po 5 min, 24 urah, 48 urah, pH=1 42

Preglednica 19: Delež hidroliziranega Aspirina pri pH=1 43

Graf 1: Izguba vode pri sušenju na sobni temperaturi za polimer KŠ1-G(ASA)	29
Graf 2: Umeritvena premica za salicilno kislino	37
Graf 3: Logaritmična odvisnost med absorbanco (posledica hidrolize Aspirina) in časom.....	38
Graf 4: Grafična predstavitev naraščanja koncentracije salicilne kisline , ki je nastala kot produkt hidrolize Aspirina po 5 min, 24 urah, 48 urah	40
Graf 5: : Spreminjanje absorbance v času 48 ur (hidroliza biopolimera z vključenim Aspirinom), pH=1	42
Graf 6: Primerjava deleža Aspirina, ki je hidroliziral pri pH=1 in pH=7.	44

Kazalo Kemijskih enačb

Kemijska enačba 1: Hidroliza Aspirina®	35
Kemijska enačba 2: Tvorba vijolično obarvanega kompleksa salicilne kisline in Fe(III) ionov (Keuc, 2011).....	35

POVZETEK

Biorazgradljivi polimeri imajo zaradi svojih lastnosti velik potencial na različnih področjih uporabe. V nalogi sem preučil lastnosti biorazgradljivih polimerov in njihov primernosti za uporabo v medicinske namene – to je za držala otroških zobnih ščetk in kot sisteme za prenos terapevtskih sredstev. V ta namen sem pripravil različne kombinacije termoplastičnega škroba, preučil njihove kemijske in fizikalne lastnosti (gostoto, natezna trdnost, gorljivost, topnost v vodi, bazah, kislinah in organskih topilih). Rezultati poskusov kažejo, da je polimer sintetiziran iz čistega škroba (p.a.), z glicerolom kot mehčalcem, najbolj primeren za izdelavo držal za zobne ščetke, termoplastičen škrob narejen iz jedilnega škroba pa za prenos tistih zdravil, ki so strukturno podobna aspirinu (acetilsalicilni kislini) in zahtevajo sproščanje skozi daljše časovno obdobje.

Ključne besede: biorazgradljivi polimer, termoplastičen škrob, sredstva za prenos terapevtskih sredstev

ZAHVALA

Rad bi se zahvalil vsem, ki ste mi pri nalogi pomagali, predvsem pa mentorici, ki me je odlično vodila skozi nalogo.

1 UVOD

Mladi starši se pri otrocih pogosto srečujejo s težavami rednega čiščenja mlečnih zob. V svoji stiski se obračajo tudi na internetne svetovalnice, kjer lahko preberemo naslednji dopis:¹

»Imam 21-mesečno hčerko, ki si pod nobenim pogojem ne pusti umivati zobkov. Poskušala sem že na vse načine, a ne pusti, niti z vodo ne, kaj šele z zobno pasto. Velikokrat ji dam kakšno jabolko, da si vsaj malo očisti zobe, to pa je tudi vse. Zelo me skrbi, da ne bi dobila kariesa. Kakšni so prvi znaki kariesa? Ali se ga v začetnem stadiju da pozdraviti? K zobozdravniku ne moreva iti, saj ji že otroški zdravnik mora na silo odpreti usta, kaj šele zobozdravnik. Kaj naj storiva?«

Zdravniki svetujejo uporabo prvih zobnih ščetk preko igre. Torej zobna ščetka kot igračka, ki ima posebno nalogo. Bolj strogi dodajajo posebne zahteve, ki jih učinkovita zobna ščetka mora imeti (trdota ščetin, njihova lega, dolžina,...). Proizvajalci med seboj tekmujejo v oblikovanju različnih držal, ki spominjajo na junake iz risank ali pravljič; vse z enim samim namenom – da bi si otroci radi redno in temeljito čistili zobe. Pri tem seveda ni nepomembno iz kakšnih materialov so prve zobne ščetke. V lanskem letu so iz vseh drogerij odstranjevali zobno ščetko, ki ji je na mestu, kjer so pritrjene ščetine odpadal oval, nevaren pri zaužitju (2012)². Zveza potrošnikov je zelo pozorna na materiale vseh izdelkov, ki jih majhni otroci lahko nesejo v usta. Zanje veljajo še posebej strogi standardi izdelave (Ur.l. RS št.101/2003).³

Druga težava, ki jo mlada mamica izpostavlja v svojem vprašanju zobozdravnici je, da majhni otroci velikokrat ne želijo odpreti ust pri rednih zdravniških pregledih, kaj šele pogoltniti zdravila, v primeru, da ga potrebujejo (npr. sirupi in tabletki).

V inovacijskem predlogu sem poskušal ta dva problema reševati skupaj.

Moje izhodišče je bilo, da mora prva zobna ščetka biti mnogo bolj podobna igračkam, ki jih malčki uporabljajo pri rasti prvih zobkov (t.i. grizljala ali obročki za žvečenje), kot pravi zobni ščetki. Takšna zobna ščetka bi pomenila prehod med grizjalom (=obročkom za žvečenje) in zobno ščetko. Narejena

¹ Vir: http://www.zobozdravstvo.com/aktualna_vprasanja.html, povzeto 2.2.2013

² Vir: http://www.ringaraja.net/clanek/odpoklic-otroske-zobne-scetke-elmex_5457.html, 2.2.2013

³ Zakon o splošni varnosti proizvodov (Ur.l. RS št. 101/2003). http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r07/predpis_ZAKO3707.html, povzeto: 2.2.2013.

mora biti iz materiala, ki je povsem neškodljiv (biorazgradljiv), primerne čvrstosti in trdote ter seveda odporen na grizljanje, žvečenje in drgnjenje ob mlečne zobke.

Oralni vnos zdravil pri malčkih bi lahko bil lažji, v kolikor bi jih sredstvo vnosa spominjalo na nekaj prijetnega; morda otroški piškot za prav posebne namene? V obeh primerih pa mora biti material povsem neškodljiv, pa čeprav pride do delne razgradnje.

1.1 Cilj inovacijskega predloga

Razviti biopolimer, osnovan na škrobu, katerega osnovne sestavine imajo naslednje lastnosti:

1. primerno trdoto in elastičnost,
2. biokompatibilnost v primeru zaužitja,
3. odpornost na encimsko in bakterijsko flora ustne votline,
4. ga lahko uporabimo kot material za izdelavo prvih zobnih ščetk,
5. ga lahko uporabimo kot sredstvo za prenos terapevtskih sredstev.

1.2 Hipoteze

H1: Biorazgradljivi polimeri narejeni na osnovi koruznega škroba so lahko primeren material za izdelavo otroških zobnih ščetk.

H2: Biorazgradljivi polimeri narejeni na osnovi koruznega škroba so lahko primeren material za vgradnjo terapevtskih učinkovin.

H3: Erozijski sinteziranega polimera je v primeru in vitro površinska hidroliza, zato je sproščanje terapevtskih snovi počasno in enakomerno.

H4: Erozijski sinteziranega polimera je v primeru encimske razgradnje notranja (volumska).

H5: Hidroliza biopolimera na osnovi koruznega škroba teče hitreje ob dodatku katalizatorja (npr. kislina hidroliza).

H6: Vsak dodatek k osnovnemu matriksu biopolimera bo vpliva na njegove lastnosti.

2 TEORETIČNO OZADJE

Polimeri so sestavljeni iz monomerov in imajo visoko molsko maso (od več tisoč do milijon g/mol). Monomeri, ki tvorijo polimere, imajo lahko različno prostorsko zgradbo: nerazvejano, razvejano in zamreženo.

Poznamo naravne, sintetične in pol-sintetične polimere. Naravni se delijo na organske (npr. lignin, kavčuk, škrob) in anorganske (npr. silikati). Sintetični polimeri pogosto nadomeščajo naravna gradiva, predvsem zaradi njihove nižje cene, lažjega načina pridobivanja in možnosti prilagajanja njihovih lastnosti. Pol-sintetični polimeri so modificirani naravni polimeri (Dolenc, 2010, str. 178). Reakcije sinteze polimerov, t.i. polimerizacije, v osnovi delimo v dve skupini:

- a) stopenjske (polikondenzacije) in
- b) verižne (adicijske), slednje pa se po mehanizmu delijo na anionske, kationske, radikalske in koordinativne polimerizacije (Dolenc, 2010, str. 182-188).

2.1 Kaj so polimeri?

Polimeri so makromolekule, ki so sestavljene iz ponavljajočih se enot monomerov; verige polimera se med seboj povezujejo z vodikovimi in Van der Waalsovimi vezmi ter ionskimi oz. drugimi elektrostatskimi interakcijami. Glede na izvor (Vroman, 2009, str. 307) delimo polimere na:

- a) naravne in
- b) sintezne.

Naravni polimeri so v klinični uporabi že vrsto let in vključujejo polisaharide (npr. škrob, dekstran, alginat, hitosan, hialuronska kislina) in proteine (npr. kolagen, albumin, želatina, fibrin). Naravne polimere, kot so volna, svila, bombaž, roževina, usnje itd., človeštvo že dolgo uporablja. Od zgradbe polimera so odvisne njegove lastnosti.

Preglednica 1: Odvisnost lastnosti polimerov od njihove zgradbe (Kornhauser, 1996, str. 97)

kriterij	Lastnosti
dolžina verige	Čim daljša je veriga, tem močnejši je polimer.
razvejanost verige	Nerazvejane verige se dobro zlagajo, polimer ima visoko natezno trdnost; čim bolj razvejana je veriga, tem težje se molekule polimera zlagajo skupaj in tem manjše obremenitve polimer prenese.
stranske skupine na verigi	Čim bolj polarne so funkcionalne skupine na verigi polimerne molekule, tem večje so privlačne sile med temi molekulami in tem večjo obremenitev prenese polimer.
zamreženje	Čim bolj so verige molekul polimera zamrežene (zlasti, če jih povezujejo kovalentne vezi), tem bolj trd je polimer in tem težje se tali.

Tehnološka razvrstitev polimerov je osnovana glede na njihovo obnašanje pri segrevanju. Tako ločimo

a) termoplaste in

b) duroplaste (polimerne smole).

Duroplasti v vodi niso topni, zelo slabo v organskih topilih, so taljivi, če jih segrevamo otdrjijo (ponovna segrevanja tega ne spremenijo, zato jih lahko oblikujemo samo enkrat). (Kornhauser, 1996, str. 97-100)

Termoplastov je na svetovnem trgu največ (80%). So taljivi, pri segrevanju se zmečajo in jih lahko ponovno oblikujemo (ko se ohladijo obdržijo novo obliko), so tudi topni v organskih topilih. Termoplasti, ki imajo elastične lastnosti imenujemo elastomeri. Zanje so značilne dolge zvite molekulske verige, ki se ob nategu raztegnejo in po njem spet zvijejo ((Kornhauser, 1996, str. 97-100).

Termoplasti se lahko delijo na amorfne polimere, kristalinične polimere in polimerna vlakna. Amorfni polimeri sestavljeni iz linearnih molekul, ki ohranjajo manjšo sposobnost zvijanja in drsanja molekul druga ob drugo. Ob ohlajanju postanejo krhki (temperaturo pri kateri se to zgodi imenujemo steklasti prehod). Kristalinični polimeri zaradi dolgih verig niso urejeni v povsem pravilne kristale; med kristaliničnimi območji ostanejo amorfna področja, ki povečajo elastičnost teh polimerov. Polimerna vlakna so urejena linearno (omogoča kristaliničnost), verige so delno gibljive, med njimi obstajajo močne medmolekulske sile, ki ne povzročajo zamreženja.

Polimeri se delijo tudi glede na to ali so sestavljeni iz enakih ponavljajočih se monomerov (homopolimeri) ali dveh ali več različnih monomerov (kopolimeri). Po lastnostih se kopolimeri od homopolimerov razlikujejo predvsem v tališčih, topnosti, obstojnosti pri višjih temperaturah, žilavosti in elastičnosti. Kopolimeri so lahko alternirajoči (imajo urejeno zaporedje monomerov ali pa naključni (imajo neurejeno zaporedje monomerov); poznamo še blok kopolimere (pri njih se v verigi ponavljajo večja zaporedja monomerov) in cepljene kopolimere, ki imajo na nerazvejano verigo osnovnih monomerov pritrjene verige drugih monomerov.

2.2 Biorazgradljivi polimeri

Biorazgradljivi polimeri so v zadnjih dvajsetih letih doživeli hiter razvoj in se danes v veliki meri uporabljajo na področju farmacije, klinične biomedicine in tkivnega inženirstva. Predstavljajo material, ki je bistveno pripomogel k razvoju medicinskih pripomočkov, kot so začasne proteze, tridimenzionalne porozne strukture (ogrodja v tkivnem inženirstvu) in v razvoju sodobnih dostavnih sistemov za vnos terapevtskih učinkovin. Takšni dostavni sistemi omogočajo stabilnost in kontrolirano ter podaljšano sproščanje vgrajenih učinkovin (Qiu in Bae , 2006, str. 1; Dailey s sodel., 2005, str. 137). Tudi zaradi tega je razvoj biopolimerov v zadnjih letih zelo intenziven.

Biološka razgradljivost je opredeljena kot (Kornhauser, 1996, str. 97): »*proces degradacije polimernega materiala pod vplivom biotskih (živih) dejavnikov.*« Razgradnja vodi do osnovnih molekul, kot so voda, ogljikov dioksid in manjše organske molekule. Te lahko vstopajo v presnovne procese organizma. Če ti produkti niso strupeni in tudi ne škodujejo organizmu.⁴

Biorazgradljivi polimeri so naravnega ali umetnega izvora. Polimeri naravnega izvora so prisotni v vsakem živem bitju in življenje brez njih je težko predstavljivo. Mednje sodijo proteini, maščobe, nukleinske kisline, ogljikovodiki, celuloza, škrob, poliestri itn. Nastajajo s pomočjo encimsko kataliziranih reakcij.

Viri za umetno pridobljene biopolimere (nekateri od njih so tudi biorazgradljivi) so lahko obnovljivi viri, fosilna goriva (neobnovljiv vir) ali njuna mešanica.

⁴ Proces razgradnje organskih snovi v anorganske imenujemo mineralizacija.

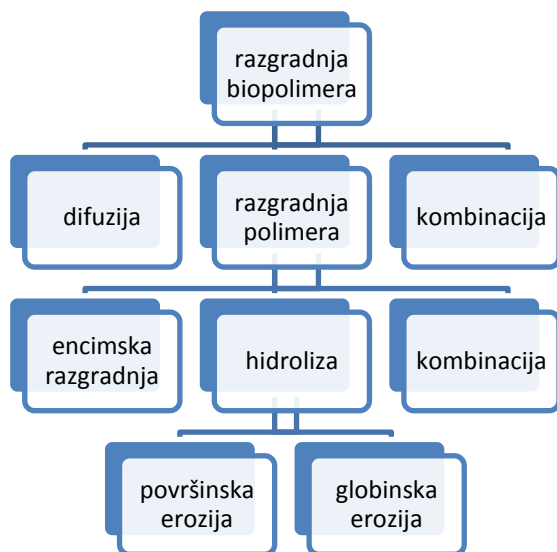
Med najpomembnejše kriterije za uspešno uporabo biorazgradljivih polimerov sodi poznavanje in razumevanje mehanizmov preko katerih se določen polimer razgrajuje/erodira in se v končni fazi resorbira z mesta aplikacije (uporabo v medicini). Pretvorbo polimerov v vodotopne produkte najbolje opišemo s terminom bioerozija (Cergol, 2012, str. 48). Bioerozijski proces trdnega polimernega ogrodja je povezan z makroskopskimi spremembami v videzu, kot so nabrekanje, deformacija in razpad strukture in izguba mase (Sabir, 2009, str. 1357).

2.2.1 Proces razgradnje biopolimera

Razgradnja polimernega ogrodja je kemijski proces, kjer v prisotnosti molekul vode poteka hidrolitična cepitev skupin v glavni verigi polimera, stranskih verigah in/ali prečnih povezavah med polimernimi verigami. Erozijski procesi sodi med fizikalne procese in vključuje difuzijo vode, razpletanje in odplavljanje polimernih verig ter raztapljanje polimera. Glede na mehanizem erozije delimo na površinsko in globinsko (Cergol, 2011, str. 51). Na mesto, kjer poteka erozija vplivajo:

- a) stabilnost vezi,
- b) stopnja kristaliničnosti,
- c) hidrofobnost/hidrofilnost polimera,
- d) lastnosti razgradnih produktov (topnost, kislost) in
- e) poroznost polimernega matriksa.

Organigram 1: Razgradnja biopolimera



Molekulska masa polimera oz. dolžina polimerne verige prav tako vpliva na razgradnjo polimera. Večja kot je molekulska masa polimera, daljše so polimerne verige. Dolge polimerne verige tvorijo med seboj večje število interakcij, kar zmanjša razdaljo med njimi in tako preprečuje dostop molekul vode do labilnih vezi v polimeru. Na potek hidrolize vplivajo morfološke lastnosti polimera, kot sta semikristaliničnost in amorfnost. Polimerne verige so v kristaliničnem področju gosto naložene in urejene ena ob drugo, kar preprečuje prodiranje molekulam vode. Posledično poteče najprej hidroliza amorfnih področij in površinska hidroliza kristaliničnih področij, delež kristaliničnosti polimera pa se med potekom erozije postopno povečuje. Ta vpliv je posebno pomemben pri polimerih z veliko stopnjo kristaliničnosti ((Cergol, 2011, str. 52)

2.2.1.1 Globinska erozija

Pri globinski eroziji je hitrost difuzije molekul vode večja od hitrosti razgradnje polimera v vodotopne produkte in poteka homogeno znotraj polimernega ogrodja. Razlaga globinske erozije je zelo kompleksna, hitrost reakcije pa precej nepredvidljiva. Za globinsko erozijo je značilno, da se zunanji volumen polimernega ogrodja ne spreminja veliko, povečuje pa se notranji, prosti volumen, dokler polimer »nenadoma« ne razpade.

2.2.1.2 Površinska erozija

V nasprotju z globinsko erozijo je pri površinski eroziji hitrost difuzije molekul vode manjša od hitrosti erozije. Zatorej je erozijski proces omejen na površino polimera, ki skozi čas postaja vse manjši, ker razmerje med maso in prostornino ostaja konstantno. Izguba mase je postopna in skoraj linearna v proučevanem časovnem intervalu. Kinetika površinske erozije je bolj predvidljiva, saj je njena hitrost sorazmerna površini polimera. Z izdelavo dostavnih sistemov iz polimerov, ki se razgrajujejo s površinsko erozijo, je omogočena večja zaščita učinkovine v ogrodju. Takšne polimeri so poliortoestri, polifosfati in polianhidridi, kjer so v hidrofobni verigi prisotne skupine, ki so zelo občutljive za hidrolizo (Cergol, 2011, str. 45).

Razgradnja biopolimerov, ki ne poteka hidrolitično, poteka z oksidacijo in pod vplivom svetlobe (fotoliza). Ključni dejavniki, ki vplivajo na hitrost razgrajevanja so (Batycky, 1997, str. 1454):

- ✓ Kemična stabilnost hidrolitično reaktivnih skupin v glavni verigi polimera.
- ✓ Hidrofilnost/hidrofobnost monomerov v polimerni verigi.
- ✓ Molekulska masa polimera.
- ✓ Proces proizvodnje in geometrija polimernega ogrodja.
- ✓ Morfološke lastnosti polimera.

Dovzetnost reaktivnih skupin za proces hidrolize v verigi polimera je poglobljen parameter, ki vpliva na hitrost procesa hidrolize. V splošnem je znano, da anhidridna vez hitreje hidrolizira kot esterska, esterska pa hitreje kot amidna, torej bo hidroliza polianhidridov hitrejša kot hidroliza poliestrov ali poliamidov. Pomembna je tudi prepustnost polimernega ogrodja za molekule vode. Le-ta je odvisna od hidrofilne oziroma hidrofobne narave monomerov v polimeru in ima ključen vpliv na hitrost hidrolize. Hidrofobne molekule imajo manjšo težnjo za vezavo molekul vode, saj ne tvorijo vodikovih vezi.

Razgradnja lahko poteka aerobno (vodijo jo aerobni mikroorganizmi) pri čemer nastajajo voda, ogljikov dioksid in biomasa ali anaerobno (vodijo jo anaerobni mikroorganizmi), pri čemer nastajajo metan in ogljikov dioksid, vodik, vodikov sulfid in biomasa.

Hitrosti razgradnje so različne; vsekakor je hitro razgradljiva bioplastika snov, ki je lahko del komposta (del organskih odpadkov), tiste, ki potrebujejo več časa za razgradnjo pa se morajo industrijsko

kompostirati (zato je pomembno, da se je ne odlaga v naravo, dokler se ne razgradi). Razgradnja pri industrijskih pogojih (pomembna je predvsem temperatura, ki mora biti nad 60°C) poteka največ 180 dni (Kornhauser, 1996, str. 97).

2.3 Neželeni učinki biorazgradnje polimerov

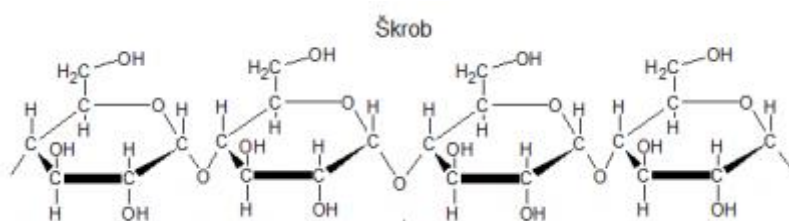
Med neželene učinke biorazgradnje lahko sodijo:

1. prehitra razgradnja, oziroma razgradnja polimera ali plastike ko je le-ta še v rabi.
2. poraba obnovljivih virov, ki bi jih lahko uporabili kot živila (primer polimerov na osnovi škroba),
3. možnost ponovne uporabe materiala (razen kompost) je nizka.

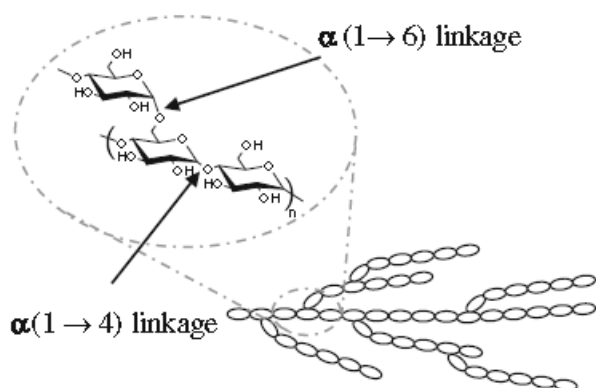
Vse druge pomanjkljivosti so povezane z načinom sintetiziranja biopolimerov.

2.4 Škrob

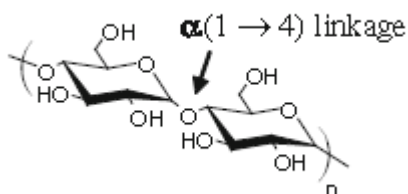
Polimer z najbolj razširjeno uporabo je les, sestavljen iz celuloznih (polimer sestavljen iz β -glukoznih enot). Zelo podoben je škrob, polisaharid v rastlinskega izvora, zgrajen iz amiloze (20-25%) in amilopektina (75-80%). Amiloza predstavlja nerazvejan polisaharid, sestavljen iz D-glukoznih enot, povezanih z α -1,4-glikozidnimi vezmi. Amilopektin ima razvejeno verigo in vsebuje α -1,4 in α -1,6 glikozidne vezi.



Slika 1: Zgradba škroba (Dolenc, 2010, str. 179)



Slika 2: Amilopketin iz škroba (Avérous, L., Pollet, E., 2012)



Slika 2: Zgradba amilozen (Avérous, L., Pollet, E., 2012)

2.4.1 Hidroliza škroba v telesu

Hidroliza škroba v telesu poteka preko prebavnih encimov, imenovanih amilaze ter ob pomoči želodčne kisline. Prebava škroba se začne že v ustih, kjer amilaza iz slin lahko začne hidrolizo škroba, ki se nadaljuje v želodcu in zaključi v tankem črevesju, kjer se nastala glukoza absorbira v krvni obtok.

2.5 Lastnosti in uporaba biorazgradljivih materialov v medicini

Skupna lastnost vsem biorazgradljivim polimerom je, da v svoji verigi (glavni, stranski, prečnih povezavah) vsebujejo skupine, ki *in vivo* s kemijsko in/ali encimsko hidrolizo razpadejo na manjše

fragmente, oligomere in monomere. Kemijska in encimska hidroliza lahko potekata paralelno in neodvisno ena od druge.



Slika 3: Vijaki (levo) in ploščice (desno) iz biorazgradljivih polimerov za fiksacijo kosti (Cergol, 2011)

Uporabo biorazgradljivih medicinskih pripomočkov dodatno zmanjša nastanek poškodb, ki lahko nastanejo pri vsaditvi/odstranitvi vsadka iz nerazgradljivih materialov, s čimer močno izboljšamo potek zdravljenja (Tormala s sodel. , 1998, str. 101).

Pogoj za uporabo medicinskih implantatov in dostavnih sistemov za vnos učinkovin v organizem sta:

- a) biokompatibilnost in
- b) ustrezna adhezija celic na mestu implantacije.

Polimeri in njihovi produkti razpada morajo biti biokompatibilni z manjšno mero imunogenosti in ne smejo povzročati vnetnih reakcij, nekroze tkiva, alergičnih reakcij ali karcinogeneze (Ikada, 2000, str. 117). Posledično morajo biti vsi biomateriali najvišje stopnje čistoče, material mora biti takšen, da ga lahko enostavno steriliziramo s konvencionalnimi metodami (γ -žarki, etilenoksidom) ter ne smejo vsebovati nečistoč, ki se lahko med uporabo izlužijo (iniciatorji, stabilizatorji, emulgatorji, plastifikatorji, nezreagirani oligomeri in monomeri), kar privede do neželenih učinkov (Ikada, 2000, str. 118). Biorazgradljivi polimeri, ki so v stiku s krvjo, morajo biti hemokompatibilni, kar pomeni, da ne smejo vezati proteinov iz plazme in krvnih celic, kar bi privedlo do lokalnega strjevanja krvi in nastanka trombov na mestu uporabe (Cergol, 2011, str.47). Pri izbiri ustreznega biokompatibilnega polimera so kritični parametri mehanske lastnosti polimera in časovni profil njegove razgradnje.

2.6 Sinteza biopolimerov

Poznamo več različnih postopkov proizvodnje biopolimerov:

- sintezni (kemijski),
- biotehnološki (s pomočjo mikroorganizmov),
- modifikacija naravnih polimerov.

Pri biotehnološki sintezi s pomočjo različnih encimov, prisotnih v mikroorganizmih, sintetiziramo polimere. Take sinteze v našem okolju neprestano potekajo. Primeri polimerov nastalih na ta način so: škrob, hitin, celuloza (Dolenc, 2010, str. 178).

Modifikacija naravnih polimerov je proces pri katerem naravnim polimerom dodamo razne snovi, da dobijo želene lastnosti (višje tališče, elastičnost, natezno trdnost itd.).

Ker bom v svojem inovacijskem predlogu kot osnovno sredstvo uporabil koruzni škrob, se bom v nadaljevanju osredotočil predvsem na biopolimere tega tipa.

2.7 Termoplastični škrobni polimer

Termoplastični škrob nastane z preobrazbo zgradbe škrobnih zrn. To dosežemo z raztapljanjem, kjer dodajamo ustrezen mehčalec, ko zmes segrevamo. Pri tem se verige polimerov, ki sestavljajo škrob običajno pretrgajo. Eden glavnih dejavnikov, ki vodi ta proces je prisotnost vode (hidroliza škroba). Škrob je v vodi topen le pri višjih temperaturah. Nabrekanje škrobnih zrn ob uporabi ustreznega zgoščevala imenujemo gelatinizacija (nastanek želatine). Dodatek mehčalca omogoča večjo homogenost končnega produkta.

Velikost in oblika škrobnih zrn sta odvisna od njihovega izvora. Velikost variira od 0.5 to 175 μm . Poleg glukoznih enot škrob vsebuje še nizke vrednosti beljakovin, lipidov in mineralov. Zgradba škroba (amiloza in amilopektin) je prikazana na slikah 1-3 (str. 14). Amiloza je linearni polisaharid sestavljen iz D-glukoze povezane z $\alpha(1\rightarrow4)$ vezmi, ki so ojačene z $\alpha(1\rightarrow6)$ vezmi. Verige amiloze imajo enojno ali dvojno helikalno obliko, zavoji pa so na $\alpha(1\rightarrow4)$ vezeh.

Amilopektin je glavna komponenta v škrobu. Tako kot amiloza je sestavljen iz D-glukoze. 95% vezi je $\alpha(1\rightarrow4)$, 5% pa $\alpha(1\rightarrow6)$. Vezi $\alpha(1\rightarrow6)$ dajejo amilopektinu močno razvejano zgradbo.

V zgradbi škroba se izmenjujejo kristalinična (večinoma sestavljena iz amilopektina) in amorfnata področja (večinoma sestavljena iz amiloze). Opazna je velika variabilnost med posameznimi viri škrobnih zrn, od 20 do 45 % (Hayashi, 1981, str. 357).

Zaradi velikega števila vodikovih vezi med polimernimi verigami je tališče škroba višje kot temperaturna točka razpada (Shogren, 1992, str. 83). Zaradi tega je delež vode v polimerih na osnovi škroba izjemno pomemben, kot tudi delež nehlapnih plastifikatorjev, kot sta npr. glicerol ali sorbitol. Oba znižata točko kristalizacije, vendar je zato potrebna termična obdelava vseh materialov (segrevanje in intenzivno mešanje).

Termoplastičen škrob pri sobni temperaturi obdrži svojo granularno strukturo. Povečanje temperature vode povzroči nepopravljivo poškodbo, saj se začne proces gelatizacije, kjer se večina amiloze raztopi, zrnata kristalna struktura izgine in škrobna zrnca zelo hitro nabreknejo (Cooke, 1992, str. 103). Ker je škrob hidrofilni material, je voda zelo dober plastifikator. Dodatek polioolov (npr. glicerola) poveča interakcijo z vodikovimi vezmi v polimerni zgradbi in še dodatno prispeva k zamreženosti cele strukture. Vendar delež glicerola nad 25% lahko pomeni ločitev posameznih faz polimera (hidrofilne in hidrofobne) (Averous, 2000, str. 4157). Koncentracije glicerola pod 12% pomenijo bistveno otrditev materiala (Hayashi, 1981, str. 358).

3 UPORABA BIORAZGRADLJIVE PLASTIKE PRI ČIŠČENJU MLEČNIH ZOB

Čas izraščanja mlečnih zob sovpada z oralno fazo v razvoju otroka. Otrok v tej fazi uporablja usta za hranjenje in tudi za raziskovanje sveta. V usta daje številne predmete (igračke), prste (ali celo dlan) in morda je to priložnost tudi za čiščenje zobkov. Takoj po izrasti prvega zobka je namreč potrebno začeti z redno nego. To postopoma postaja higienska navada, ki se ob primernem vzoru tudi avtomatizira. Mnogo staršev pove, da je otrok užival pri umivanju prvih spodnjih sekalcev, ko pa so izraščali oz. izrasli zgornji zobje, ni več želel sodelovati. Vzroki za nesodelovanje so različni. Med izraščanjem zob imajo otroci bolj občutljivo in nabreklo dlesen.

Kot smo lahko videli v prejšnjih poglavjih, je stopnja polimerizacije (bolj kristalinična in s tem netopna struktura ali pa bolj želatinasta in s tem bolj v vodi topna struktura) bistvenega pomena, ko se odločamo za uporabo polimerov za vsakdanjo rabo. Biopolimeri na osnovi škroba, primerni za izdelavo zobnih ščetk, bi morali obdržati svojo trdnost in visoko stopnjo kristaliničnosti, zato bi moral biti delež glicerola (kot primer mehčalca) in tudi delež vode v taki polimerni zgradbi čim nižji.

Za uporabo v dostavi terapevtskih sredstev pa bi želatinasti del moral narasti, to pomeni večjo količino vode v sintetiziranem biopolimeru in do 25% masnih deležev ustreznega zgoščevala. Na tej osnovi sem zastavil svoje eksperimentalno delo.

4 PRAKTIČNI DEL

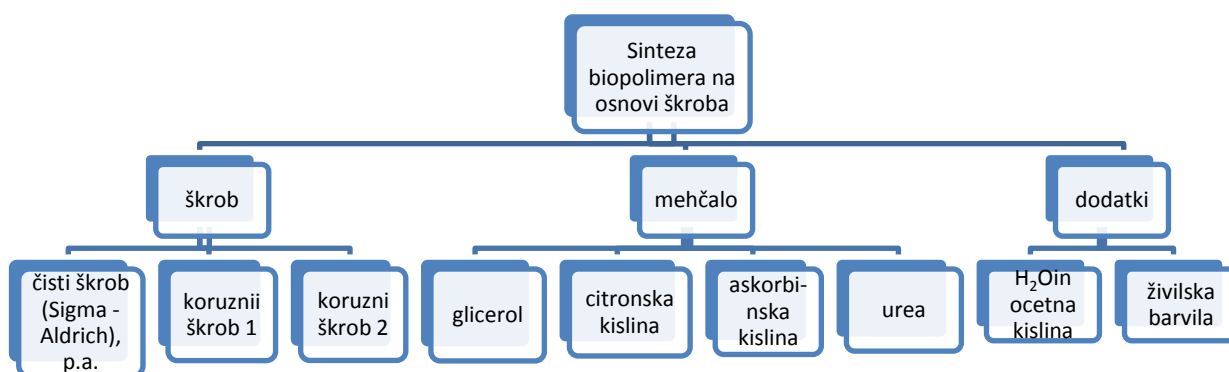
I. del

Celotno praktično delo je bilo razdeljeno v tri dele:

1. Sinteza biopolimera na osnovi škroba in izbira polimera, ki ima najboljše lastnosti za izdelavo držala zobne ščetke.
2. Preučevanje fizikalno-kemijskih lastnosti izbranega polimera za dostavo terapevtskih sredstev.
3. Analiza primera sproščanja terapevtskega sredstva na primeru Aspirina.

4.1 Sinteza biopolimera na osnovi škroba in izbira polimera, ki ima najboljše lastnosti za izdelavo držala zobne ščetke

Organigram 2: Predstavitev sinteze biopolimera



Prva serija eksperimentov je bila narejena z namenom, da ugotovimo katero sredstvo za mehčanje (glicerol, citronska kislina, askorbinska kislina, želatina, urea) je najustreznejše z vidika stopnje elastičnosti in drobljivosti polimernega produkta. Ker smo vse poskuse delali v dveh izvedbah, smo istočasno ugotavljali tudi najustreznejšo temperaturo in način sušenja (staranja) polimera.

Pripomočki:

- Čaša, 150 mL
- urno steklo
- merilni valj, 10 mL
- plastična kapalka, 3 mL
- papir za peko
- električni grelnik
- sušilnik
- elektronska tehtnica, $\pm 0,0001\text{g}$

Uporabljene snovi:

- 2 mL glicerola
- 2 mL nasičene raztopine citronske kisline
- 2 mL nasičene raztopine askorbinske kisline
- 2 mL nasičene raztopine uree
- 2 mL 5% raztopine očetne kisline
- 8 mL vode
- 2,5 g jedilne koruznega škroba 1
- 2,5 g jedilnega koruznega škroba 2
- Čisti škrob (Sigma-Aldrich, p.a)
- Živilsko barvila, meta(E102($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_9\text{S}_2$), E133($\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$))- ETOL

Potek dela:

Dva mililitra ustreznega mehčala (glej organigram 1) sem v čaši zmešal s škrobom, vodo in očetno kislino. Nato sem homogeno suspenzijo segreval in mešal toliko časa, da je polimerizirala. Nanesel sem jo na peki papir in jo pri 50°C sušil v lab. sušilniku (prva serija poskusov) ter na sobni temperaturi (2. serija poskusov). Nato sem eksperiment ponovil, pri čemer sem zamenjal vrsto koruznega škroba (drug proizvajalec).

4.1.2 Rezultati

Preglednica 2: Sinteza biopolimerov primernih za držala zobnih ščetk (sušeno v sušilniku na 50°C, 24 ur)

	KŠ1-G	KŠ1-CK	KŠ1-AK	KŠ1-Ž	KŠ1- U	ČŠ-G	KŠ1- GMB
Videz	prozoren, zelo plastičen (elastičen), homogen	prozoren (rahlo rumen), , nehomogen	neprozoren (rjav)	neprozoren (rumen)	neprozoren (rumen)	neprozoren (rumen), hrapav, steklast videz	zeleno obarvan polimer, zelo gibljiv (elastičen), vonj po meti
Trdnost	Upogljiv	krhek	zelo krhek	zelo krhek	zelo krhek	rahlo krhek	upogljiv
Elastičnost	Visoka	srednja	nizka	nizka	nizka	srednja	Izjemno elastičen
Drobljivost	Ne	da	da	da	Zelo drobljiv	ne	ne

Legenda:

KŠ1-G - koruzni škrob 1 + glicerol **KŠ1-AK** - koruzni škrob 1 + askorbinska kislina (C vitamin) **KŠ1-Ž** - koruzni škrob 1 + želatina

KŠ1- U- koruzni škrob-urea **KŠ1- GMB**- koruzni škrob 1+ glicerol + zeleno barvilo (meta) **KŠ1-CK** - koruzni škrob 1 + citronska kislina

ČŠ – G čisti škrob +glicerol

Kot vidimo iz Preglednice 2 sta z vidika elastičnosti (kompaktne strukture) najbolj ustrezna polimera z mehčalom glicerolom. V primeru dodatka treh kapljic (cca. 1,5 mL) vodne raztopine zelenega barvila Meta, se je stopnja elastičnosti še povečala. Velika razlika je bila opazna med uporabo jedilnega škroba, **KŠ1**, (85% čistoče) ter čistega škroba (p.a). V primeru jedilnega škroba so bili izkoristki sinteze bistveno višji kot pri čistem škrobu in tudi potek polimerizacije povsem drugače. Pri čistem škrobu je bilo potrebo saj 20 min intenzivnega segrevanja in mešanja; da je nastal steklast polimer. Pri jedilnem (koruznem) škrobu je polimerizacija potekla znotraj 5 min, dobili smo rumeno obarvane polimere.

Polimeri sušeni na sobni temperaturi so bili zaradi večjega deleža vode bolj elastični, vendar je bil zopet najboljši rezultat dosežen s kombinacijo KŠ1-G in KŠ1 –GMB.

Zamenjava jedilnega škroba (z KŠ2) ni prinesla opaznih razlik v izgledu in zunanji strukturi sintetiziranih polimerov. Kasneje se je izkazalo, da kvaliteta obeh koruznih škrobov le ni bila identična.

Zaradi dobrih rezultatov (ohranitev elastičnosti) smo v nadaljevanju izvedli serijo poskusov, kjer smo polimeru pod oznako KŠ1-G dodali različna živilska barvila ter ekstrahirano barvilo rdečega zelja.

4.2 Sinteza termoplastičnih polimerov na osnovi koruznega škroba z dodanimi živilskimi barvili

Ker je bil 1. poizkus narejen tudi z glicerolom, ki mu je bilo dodano živilsko barvilo meta (E102, E131) in je njegova elastičnost bila izjemno visoka, smo v 2. seriji poskusov, kjer je kot mehčalec posvoda bil uporabljen glicerol, dodali še druga živilska barvila. Preizkušali smo naslednje snovi:

- **Zeleno barvilo** (Foster Clarks')(E102(C₁₆H₉N₄Na₃O₉S₂), E133(C₃₇H₃₄N₂Na₂O₉S₃), konzervans E211(NaC₆H₅CO₂), citronska kislina E330(C₆H₈O₇))
- **Meta**(E102(C₁₆H₉N₄Na₃O₉S₂), E133(C₃₇H₃₄N₂Na₂O₉S₃))
- **Modro barvilo** (E128(C₁₈H₁₃N₃Na₂O₈S₂), E122(C₂₀H₁₂N₂Na₂O₇S₂), konzervans E211 (NaC₆H₅CO₂), citronska kislina E330(C₆H₈O₇))
- **Vanilja** (Foster Clarks')(E102(C₁₆H₉N₄Na₃O₉S₂), E110(C₁₆H₁₀N₂Na₂O₇S₂), E151(C₂₈H₁₇N₅Na₄O₁₄S₄), E124(C₂₀H₁₁N₂Na₃O₁₀S₃))
- **Banana** (E102(C₁₆H₉N₄Na₃O₉S₂))

- **Višnja** (E122(C₂₀H₁₂N₂Na₂O₇S₂), E151(C₂₈H₁₇N₅Na₄O₁₄S₄), E124(C₂₀H₁₁N₂Na₃O₁₀S₃), E110(C₁₆H₁₀N₂Na₂O₇S₂))

Vsi polimeri so bili en teden sušeni na sobni temperaturi.

- Pripomočki:
- Čaša, 150 mL
- kalup iz stiropora
- merilni valj, 10 mL
- plastična kapalka, 3 mL
- papir za peko
- električni grelnik
- elektronska tehtnica, ±0,0001g

Uporabljene snovi:

- 2 mL glicerola
- 2 mL 5% raztopine očetne kisline
- 8 mL vode
- 2,5 g koruznega škroba 1)
- Barvila (meta, Zeleno barvilo (Foster Clarks'), Modro barvilo, Vanilja (Foster Clarks'), Banana in Višnja)

Potek dela

Polimere sem pripravil na isti način kot pri prvih dveh serijah poskusov; vsi biopolimeri so bili pripravljene na kot KŠ1-G, vsakemu pa je bilo dodano 1,5 mL barvila.

4.1.2 Rezultati poskusov z različni živilskimi barvili

Preglednica 3: Uporaba različnih živilskih barvil pri sintezi biopolimera

	Zeleno barvilo	Meta	Modro barvilo	Vanilja	Banana	Višnja	Ekstrakt rdečega zelja
Opis videza	Polimer ni homogen, zgornji del zasušen, spodnji precej geliran.	Izjemno drobljivo neuporabno za nadaljnje poizkuse.	Zgornja plast ni zasušena, zelo elastičen, vendar še vedno precej želirana masa.	Zgornji del zasušen, spodnji ni homogen, stopnja geliranost je velika.	Zasušen razpokan zgornji del, drobljiv, spodnji del; je mehka masa.	Zgornji del osušen, spodnji mehek zelo elastičen.	Svetlo-modra polimerna masa, zelo drobljiva, neelastična.
Masa ($\pm 0,001\text{g}$)	2,031	Ni izmerjena	7,220	4,405	4,010	4,626	2,997

Opazimo, da so mase pridobljenih polimerov izjemno različne, kljub identičnemu načinu njihove priprave. Menim, da je osnovi razlag nabrekanje polimerov v vodnih raztopinah dodanih barvil. Očitno je delež vode potrebno izjemno skrbno kontrolirati. Iz poskusa smo zaključili, da ekstrakt rdečega zelja daje zelo lepo obarvane modre polimere, ki imajo homogen izgled in je, glede na problematičnost drugih živilskih barvil, zelo uporaben za obarvanje končnih izdelkov.

5.1 LASTNOSTI SINTETIZIRANIH POLIMEROV

5.2 Kemijska odpornost sintetiziranih polimerov (topnost pri različnih vrednostih pH)

Pripomočki:

- urno steklo
- plastične kapalke, 3 mL

Uporabljene snovi:

- obarvani polimeri iz serije poskusov pod 3.2 enoto
- pufer s pH=4,00
- pufer, pH=9,5
- pufer s pH=7

Potek:

Vsak obarvan polimer sem razrezal na 3 primerljive kose, vsakega stehtal, in jih nato potopil v kislno okolje (pufer pH=4), nevtralno okolje (pufer pH=7), ter bazično okolje (pH=9,5). Po 10 minutah sem zabeležil vse spremembe, ki so zbrane v preglednici 4.

5.2.1 Rezultati poskusa

Preglednica 4: Vpliv različnih pigmentov na strukturo polimera KŠ1-G po 10 min izpostavljanja različnim pH okoljem

	Kislo (pH 4)	Bazično (pH 9,5)	Nevtralno (pH 7)
Zeleno barvilo	Barvilo se izloča v pufer. Ni razpada polimera.	Barvilo se izloča v pufer. Zelo hiter razpad polimera.	Barvilo se izloča v pufer. Polimer razpada.
Modro barilo	Barvilo se izloča v pufer. Barva polimera postaja svetlejša. Ne opazimo razpada polimera.	Polimer najmanj spušča barvo. Barva postaja svetlejša. Ne opazimo razpada polimera.	Polimer najmanj spušča barvo. Barva postaja svetlejša. Ne opazimo razpada polimera.
Vanilja	Razbarvanja ni opaziti, vendar polimer spremeni barvo. Polimer razpada zelo hitro razpada.	Razbarvanja ni opaziti, vendar polimer spremeni barvo. Polimer razpada	Razbarvanja ni opaziti, vendar polimer spremeni barvo. Polimer razpada
Banana	Ni spremembe barve ,vendar polimer spremeni barvo. Ne opazimo razpada polimera..	Ni spremembe barve, vendar polimer spremeni barvo. Ne opazimo razpada polimera.	Ni spremembe barve, vendar polimer spremeni barvo. Ne opazimo razpada polimera.
Višnja	Ni spuščanja barve. Barva rahlo osvetli. Ne opazimo razpada polimera.	Ni spuščanja barve. Barva rahlo osvetli. Ne opazimo razpada polimera.	Ni spuščanja barve. Barva rahlo osvetli. Ne opazimo razpada polimera.
Zelje	Barva rahlo prosvetli (svetlo modro). Ne opazimo razpada polimera.	Obarva se turkizno zeleno. Ne opazimo razpada polimera.	Sprememba barve ni opazna. Ne opazimo razpada polimera.

Na osnovi rezultatov poskusa vidimo, da polimeri obarvani z zelenim živilskim barvilom in modrim živilskim barvilom, niso primerni za barvanje polimernih termoplastičnega škroba, saj se prehitro izlužijo iz strukture polimera. Ponoven pregled smo opravili čez 24 ur.

Preglednica 5: Vpliv različnih pigmentov na strukturo polimera KŠ1-G po 24 urni izpostavljanja različnim pH okoljem

	Kislo (pH 4)	Bazično(pH 9,5)	Nevtralno (pH 7)
Zeleno barvilo	Struktura polimera ostaja nespremenjena.	Barvilo se izloča v pufer. Polimer je razpadel.	Barvilo se izloča v pufer. Polimer je razpadel.
Modro barilo	Polimer je delno razpadel.	Polimer je delno razpadel.	Polimer je delno razpadel
Vanilja	Vidno razbarvanje, polimer izgubi na trdoti.	Vidno razbarvanje, polimer izgubi na trdoti	Vidno razbarvanje, polimer izgubi na trdoti
Banana	Delno razbarvan polimer. Polimer ne razpada.	Zelo razbarvan polimer. Polimer delno razpadel.	Razbarvanja ni opaziti. Polimer delno razpadel.
Višnja	Vidno razbarvanje, polimer izgubi na trdoti.	Vidno razbarvanje, polimer izgubi na trdoti.	Vidno razbarvanje, polimer izgubi na trdoti.
Zelje	Polimer se ne razbarva in struktura ostane nespremenjena.	Delno razbarvan polimer. Polimer ne razpada.	Delno razbarvan polimer. Polimer ne razpada.

Če primerjamo rezultate v preglednici 3 in 4 opazimo, da le polimer KŠ1-G, obarvan z ekstraktom rdečega zelja, v kislem okolju (pH=4) ni razpadel in se ni razbarval. V nevtralnem okolju, je bilo najmanj sprememb opaziti na polimeru KŠ1-G obarvanem z ekstraktom iz rdečega zelja, pri čemer smo po 24 urah opazili vseeno delno razbarvanje. Podobno velja za bazičen pH. Zaključujemo, da je najustreznejše barvilo za barvanje polimerov na osnovi jedilne škroba ekstrakt rdečega zelja.

Ker se je do te točke preiskovanja polimerov izkazalo, da imajo polimeri zgrajeni iz KŠ1-G, z dodanim 1,5 mL ekstrakta na izhodiščno maso polimera opisano v proceduri pod 3.1., najbolj elastično in obenem trdno strukturo, ki je odporna na tako na kisel, nevtralen kot bazičen pH (v razponu od 4,0-9,5) je ta kombinacija bila izbrana kot najustreznejša za sintezo držala zobne ščetke. Seveda pa je bilo potrebno preizkusiti še njene fizikalne lastnosti.

5.3 Sinteza termoplastičnega polimer tipa KŠ1_G z dodano acetilsalicilno kislino

Pripomočki:

- čaša, 150 mL
- urno steklo
- merilni valj, 20 mL
- plastična kapalka ,3 mL
- papir za peko
- elektronska tehtnica, $\pm 0,0001\text{g}$

Uporabljene snovi:

- 2 mL (4 mL) glicerola
- 2 mL (4 mL)5% raztopine očetne kisline
- 8 mL (16 mL) vode
- 5 g in koruzni škroba 1 (KŠ1)
- 2,5 g (5 g čistega škroba, sigma Aldrich, p.a.)- ČŠ
- 0,22300 g acetilsalicilne kisline (Aspirin®)

Potek dela:

Pripravil sem polimer KŠ1-G, KŠ2-G in vsakemu ob točki vrenja dodal še 0,2230 g acetilsalicilne kisline (Aspirin®). Sledilo je sušenje na sobni temperaturi in spremljanje izgube vode po 45 min, 165 min, in 24 urah ter za izbrani polimer še po dveh oz. treh tednih. Tretja serija poskusov je bila pripravljena s ČŠ-G, s tem, da sem količine vseh sestavin podvojil in v zadnjem poskusu namesto škroba uporabil jabolčni pektin.

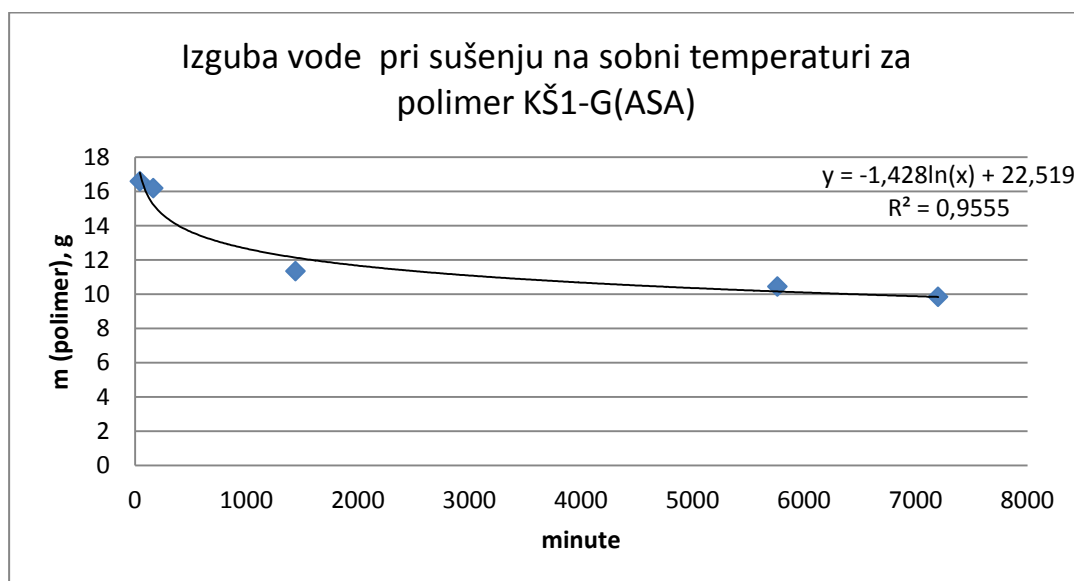
5.3.1 Rezultati

Preglednica 6: Izguba vode med sušenjem polimerov KŠ1-G(ASA) in KŠ2-G(ASA)

	KŠ2 -G(ASA)	KŠ2-G(ASA)	KŠ1- G(ASA)	KŠ1-G(ASA)
Masa ($\pm 0,0001$)g po 45 min	19,7900	16,2000	16.0000	16,6000
Masa ($\pm 0,0001$)g po 165 min	17,4500	15,1300	15,2500	16,2000
Masa ($\pm 0,0001$)g po 24 h	12,2200	9,6900	10,0700	11,3500
Δm (0,0002)g	7,5700 (38,2%)	6,5100 (40,2%)	5,9300 (37%)	5,2500 (31,6)

Iz preglednice 6 vidimo, da se koruzni škrob prvega in drugega proizvajalca med seboj razlikujeta, saj sta vzporedna poskusa pokazala, da je poprečna izguba vode pri KŠ2-G(ASA) večja, kot izguba vode v KŠ1-G(ASA) ($\approx 5\%$). Tudi v dosedanjih poskusih smo opazili, da jedilni škrob KŠ1 daje boljše rezultate (počasnejša izguba elastičnosti). Ne gre pa spregledati, da je variabilnost v primeru KŠ2 mnogo manjša kot v KŠ1. V naslednjih dneh smo spremljali izgubo vode pri polimeru KŠ1-(ASA). Rezultati so prikazani v grafu 2.

Graf 1: Izguba vode pri sušenju na sobni temperaturi za polimer KŠ1-G(ASA)



Iz grafa 1 Vidimo, da izgubo vode najlepše opišemo z logaritemsko odvisnostjo. Največja je v prvih dneh, po 3 tednih pa se masa polimera ne spreminja več bistveno.

Preglednica 7: Izguba mase vode pri uporabi čistega škroba (Sigma Aldich) in nadomestilu za škrob – jabolčnemu pektinu.

	ČŠ-G	ČŠ-G (dvoje količine)	Pektin + glicerol
masa ($\pm 0,0001$)g po 45 min	2,0000	12,1400	20,2600
masa ($\pm 0,0001$)g po 165 min	1,9995	11.6781	20,2600
masa($\pm 0,0001$)g po 24h	1,9200	9,2700	20,2200
Δm (0,0002)g	0,0800 (4%)	2,87 (23,6%)	0,04 (0,2%).

Kemijsko čisti škrob (ČŠ) nam da mnogi manjši izkoristek, kot njegovi trgovski nadomestki, ki jih poznamo pod imenom jedilni (koruzni) škrob. Že v prvi seriji poskusov smo opazili, da je tudi zgradba takih polimerov mnogo bolj steklasta; polimeri imajo nizko gostoto in so trdi. Če smo količine vseh snovi potrebne za sintezo polimera podvojili, smo se približali 75% odstotkom skupne mase polimerov dobljenih pri seriji poskusov opisanih v preglednici 5. Vendar pa je tudi skupna masa izgubljen vode mnogo nižja. Opazimo lahko, da ČŠ-G izgubil le tisti del vode, ki je bil dodan kot voda ali raztopina dodatkov.

5.4 Natezna trdnost, gostota, gorenje, in pH termoplastičnih polimerov KŠ1-G(ASA)

Pripomočki:

- Precizna tehtnica, vrvice in uteži
- merilni valj, V=10 mL
- pinceta
- Bunsenov gorilnik
- univerzalni pH lističi

Uporabljene snovi:

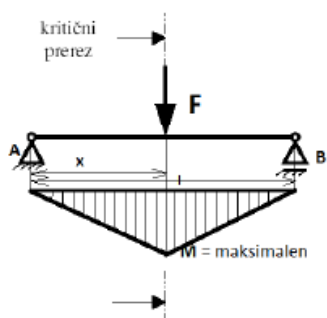
- destilirana voda, polimeri KŠ1-G(ASA)

Potek dela

Upogibna trdnost je odpornost proti upogibu ali zlomu (Avsec, 2011, str. 25). Odvisna je od raztezanja in krčenja vlaken. Spodnja vlakna se raztezajo, zgornja se krčijo. Z upogibnim poskusom dobimo podatke o:

- 1) upogibni trdnosti (lahko sklepamo o natezni trdnosti)
- 2) **upogibnosti materiala.**

Upogibni preizkusi so potrebni pri vseh gradbenih materialih. Upogibno trdnost sem izmeril tako da sem s pomočjo vrvic polimer privezal na stojalo (uporabil sem staro lab. tehtnico (točki A in B)) in na drugi del polimera obesil utež znane mase. Ker polimer ni mel pravilne oblike in poskus, ki sem ga izvajal ni bil standardiziran, sem si zabeležil le maso uteži, ki jo je polimer prenesel predno se raztrgal, preračunano na razdaljo med obema podpornima točkama kjer je bil obešen ter dolžino vrvice na katero je bil obešen.



Slika 4: Prikaz upogibne trdnosti, kjer je F-sila, A in B podpore, L- celotna dolžina, X- razdalja od podpore do točke delovanja sile in M- velikost navora (Avsec, 2011, str. 26)



Slika 5: Prirejen poskus upogibne trdnosti

2. **Merjene gostote sintetiziranih polimerov** . V manjši merilni valj napolnjen z vodo sem dal košček polimera, ki sem ga predhodno natančno stehal ter izmeril prostornino izpodrinjene vode. S pomočjo enačbe za gostoto sem izračunal gostoto polimera.
3. **Ocena gorljivost polimerov**. Koščke polimera sem pridržal s pinceto in jih sežgal nad plamenom Bunsenovega gorilnika. Opazoval sem barvo plamena in način gorenja (z ali brez plamena).
4. **pH vodnih raztopin sintetiziranih polimerov**. S pomočjo univerzalnih pH lističev sem, po 60 min namakanja v destilirani vodi, izmeril pH vodnih raztopin polimerov ().

5.4.1 Rezultati poskusov

Preglednica 8: Testiranje upogibne trdnosti, gostote, gorljivosti in pH vodnih raztopin po 60 min namakanja v destilirani vodi.

	ČŠ -G (dvojna količina)	KŠ1-G	ČŠ-G (običajni)	Pektin + glicerol
upogibna trdnost	Ni bilo mogoče določiti.	Ocena. Med 30 – 35N/mm ²	Ocena: od 25 – 35N/mm ²	Ocena: manj kot 5 N/mm ²
gostota(g/L)	690	1100	1013	627
gorenje	Gori z oranžnim plamenom; zagori naprej ob robovih, vendar plamena skoraj ne vidimo.	Zelo vnetljiv, ob gorenju se masa polimera napihne.	Zelo vnetljiv, masa polimera se napihne.	Izrazito oranžen plamen, zagori naprej ob robovih.
pH (±0,5)	6,0	5,5	5,5	5,0

5.5 Topnost ČŠ-G(ASA), KŠ1-G(ASA), pektin-glicerol (ASA) polimerov v različnih topilih

Pripomočki:

- epruvete
- stojalo za epruvete
- steklena palčka

Uporabljene snovi:

- vzorci polimerov
- 96% etanol (C_2H_6O),
- Čisti heksan (C_6H_{14})
- Čisti aceton (C_3H_6O)
- Destilirana voda

Postopek: v serijo epruvet sem nalil 4 mL vsakega topila in nato dodal primerljivo velike koščke narezanih polimerov.

5.5.1 Rezultati meritev (po 60 min)

Preglednica 9: Obnašanje izbranih polimerov z vgrajenim Aspirinom v različnih topilih.

	ČŠ-G(ASA)	KŠ1-G(ASA)	Pektin in glicerol (ASA)
absolutni etanol (96% C_2H_6O)	Ni sprememb.	Ni sprememb.	Ni sprememb.
heksan (C_6H_{14})	Ni večjih sprememb.	Nabrekanje	Nabrekanje.
aceton (C_3H_6O)	Ni večjih sprememb.	Se skrči.	Se skrči, dobi kristalno strukturo.
destilirana voda	Nabrekne.	Nabrekne in razpada.	Nabrekne, hidrolizira in razpade.



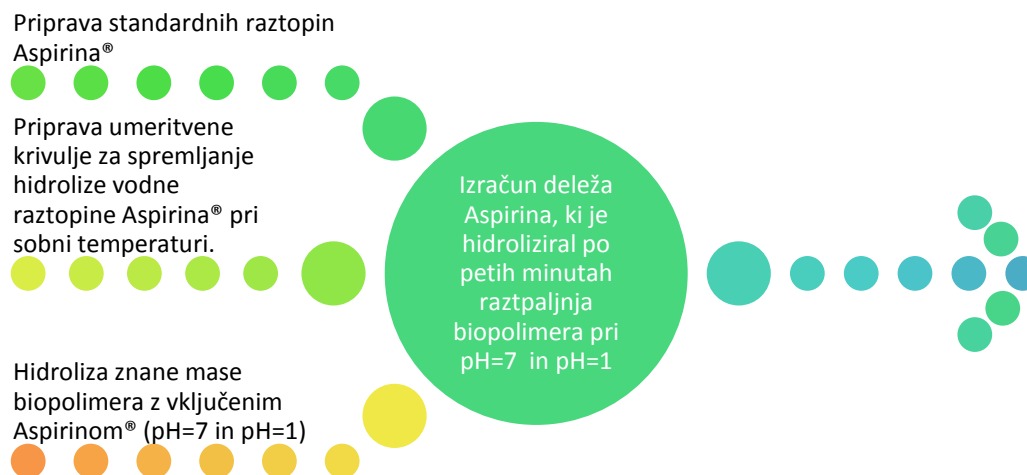
Slika 6: Povečanje volumna KŠ1-G(ASA) v destilirani vodi (desno) in primerjava z acetonom (levo).

6– BIOPOLIMER KOT NOSILEC TERAPEVTSKE UČINKOVINE

6.1 Biopolimer kot nosilec terapevtske učinkovine (primer aspirina)

Shematski prikaz dela je prikazan v organigramu št. 3.

Organigram 3: Prikaz spremljanja sproščanja aspirina iz biopolimera pri pH=7 in pH=1

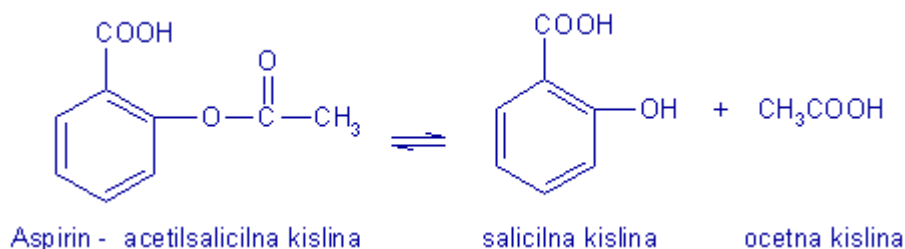


6.1.1 Izhodišče za pripravo poskusa

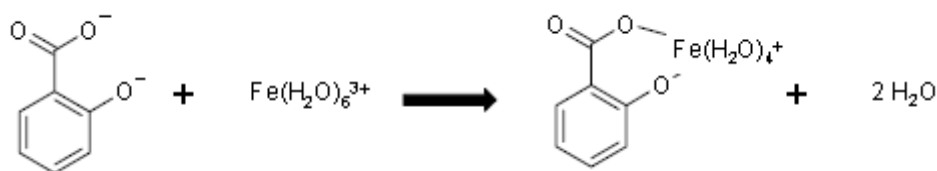
V drugem delu praktičnega dela sem želel preizkusiti biopolimere na osnovi škroba glede njihove učinkovitosti kot dostavljavca terapevtskih učinkovin. Kot terapevtsko sredstvo sem izbral Aspirin. Aspirin® je tržno/trgovsko ime za acetilsalicilno kislino⁵, ki je kemijsko gledano ester. Uporablja se za lajšanje bolečin, deluje protivnetno in znižanje telesno temperaturo. Aktivna komponenta v aspirinu (acetilsalicilna kislina) preprečuje infekcije in preprečuje nastajanje krvnih strdkov. Učinkovitost zdravila je odvisna od njegove kemijske stabilnosti. Hidroliza je lahko vzrok za kemijsko nestabilnost zdravila. Produkta hidrolize aspirina sta salicilna in očetna kislina (enačba 1).

⁵ V lekarnah na voljo brez recepta.

Kemijska enačba 1: Hidroliza Aspirina®



Salicilna kislina tvori z Fe^{3+} ioni vijoličasto-modre komplekse. Intenziteta barve je odvisna od koncentracije salicilne kisline v vzorcu ter pH. Bolj kot je raztopina nevtralen bolj rdečkast je kompleks, v bazičnem okolju je rahlo oranžen (Keuc, 2011).

Kemijska enačba 2: Tvorba vijolično obarvanega kompleksa salicilne kisline in Fe(III) ionov (Keuc, 2011)

Za izvedbo poskusa smo uporabili spektrofotomer (Veriner, OceanOptic),. acetil salicilno kislino, p.a., 0,025 mol/L $\text{Fe(NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ in 96% etanol.

Najprej smo pripravili izhodiščno raztopino salicilne kisline (Preglednica 10).

Preglednica 10: Priprava standardnih raztopin – c_0

Snov	Meritev
Začetna masa salicilne kisline (g, $\pm 0,0001$)	0,2000
Množina salicilne kisline (mol)	0,00145 ($1,45 \times 10^{-3}$)
Začetna koncentracija salicilne kisline (molL^{-1})	0,00579 ($5,79 \times 10^{-3}$)

Nato sem začetno koncentracijo salicilne kisline ustrezno redčil (preglednica 10).

Preglednica 11: Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo

Raztopine	Koncentracija (molL ⁻¹)
c_s	0,00
c₁	0,000579 (5,79 x 10 ⁻⁴)
c₂	0,000434 (4,43 x 10 ⁻⁴)
c₃	0,000289 (2,89 x 10 ⁻⁴)
c₄	0,000145 (1,45 x 10 ⁻⁴)
c₅	0,000037 (0.37 x 10 ⁻⁵)

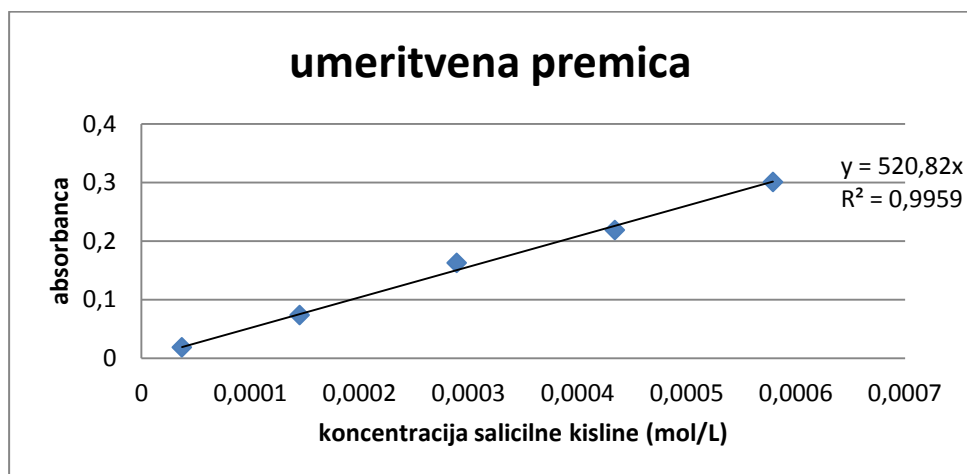
Vsaki od pripravljenih raztopin sem izmerili absorbanco.

Preglednica 12: Meritve absorbance standardnih raztopin

Raztopine	Koncentracija (molL ⁻¹)	Absorbanca, λ _{max} 530 nm
c_s	0,00	0,00
c₁	5,79 x 10 ⁻⁴	0,301
c₂	4,43 x 10 ⁻⁴	0,219
c₃	2,89 x 10 ⁻⁴	0,163
c₄	1,45 x 10 ⁻⁴	0,074
c₅	0.37 x 10 ⁻⁵	0,019

Na tej osnovi sem s pomočjo programa Excel izrisali graf za umeritveno krivuljo.

Graf 2: Umeritvena premica za salicilno kislino



6.2 Hidroliza polimera z oznako KŠ1 –G z vključenim Aspirinom®

Sledila je hidroliza biopolimera z vključenim Aspirinom®. V znano maso polimera (starega 1 dan), smo dodali destilirano vodo (20 mL) in s stekleno palčko polimerno zgradbo razbili na majhne delčke. Po 5 min, smo zmes prefiltrirali. 10 mL filtrata smo dali v 100 mL merilno bučko in do oznake napolnili z 0,025 mol/L raztopine $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$.

Preglednica 13: Podatki o hidrolizi polimera z oznako KŠ1- G(ASA) po 5 min

Snov	Meritev
Masa sintetiziranega polimera ($\pm 0,0001$ g)	16,6000
Masa Aspirina v skupni masi polimera ($\pm 0,0001$ g)	0,2230
Masa polimera, ki je bil hidroliziran ($\pm 0,0001$ g)	3,1100
Prostornina dodane destilirane vode za hidrolizo vzorca polimera ($\pm 0,05$ mL)	20,00
V (filtrata), po 5 min ($\pm 0,05$ mL)	10,00

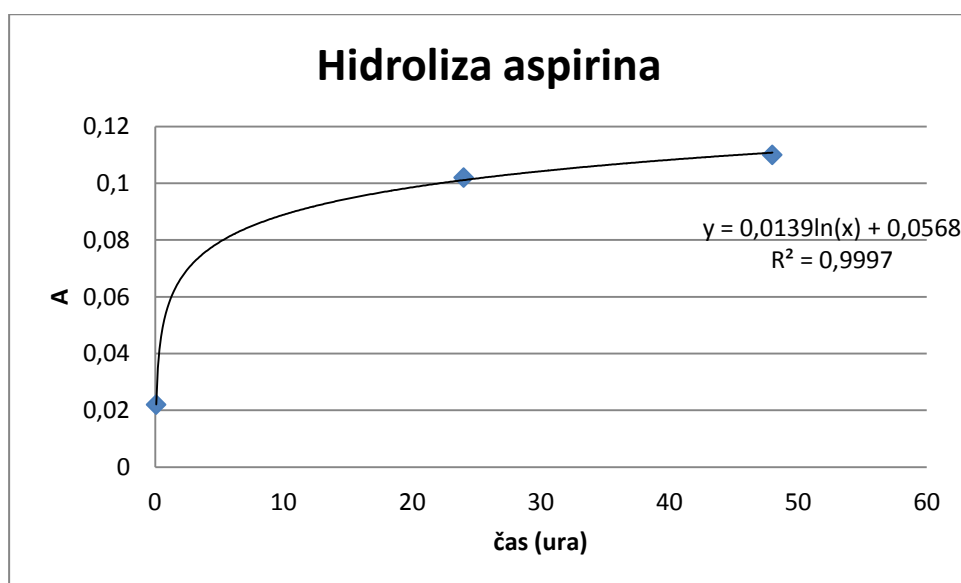
6.3 Meritev stopnje hidrolize polimera z vključenim Aspirinom®

Preglednica 14: Spreminjanje absorbance v času 48 ur (hidroliza biopolimera z vključenim Aspirinom)

Vzorec raztopine polimera z Aspirinom®	Absorbanca
Po 5 min	0,022
Po 24 urah	0,102
Po 48 urah	0,110

Rezultati meritev nakazujejo, da se hidroliza polimera in z njim tudi Aspirina® s časom povečuje, saj se povečuje koncentracija proste salicilne kisline, ki z železovimi (III) ioni tvori obarvane komplekse. Vidimo, da hidroliza poteka zelo počasi.

Graf 3: Logaritmična odvisnost med absorbanco (posledica hidrolize Aspirina) in časom



Žal na istem vzorcu sintetiziranega biopolimera ni bilo mogoče izvesti še ponovitev poskusov, ki bi omogočili izračun zanesljivosti opazovanih meritev. Skupna masa sintetiziranega polimera je bila le 16,60 g. Vzorec smo pri izvajanju meritev skoraj v celoti porabili.

6.4 Delež Aspirina®, ki se je hidroliziral v biopolimeru

S pomočjo enačbe umeritvene premice in podatkov meritev absorbance smo lahko izračunali delež Aspirina, ki se je hidroliziral pri pH=7. (Enačba premice: $y=520.82x$). Izračun je bil najprej narejen na maso polimera, ki smo ga hidrolizirali (3.11g) in nato še na celotno maso polimera, ki smo ga sintetizirali in vanj dodali (vključili) Aspirin® (16,60g).

Primer izračuna:

$$y=520.82x \quad Y=0,022$$

$$X=c(\text{salicilne kisline})=4,22 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

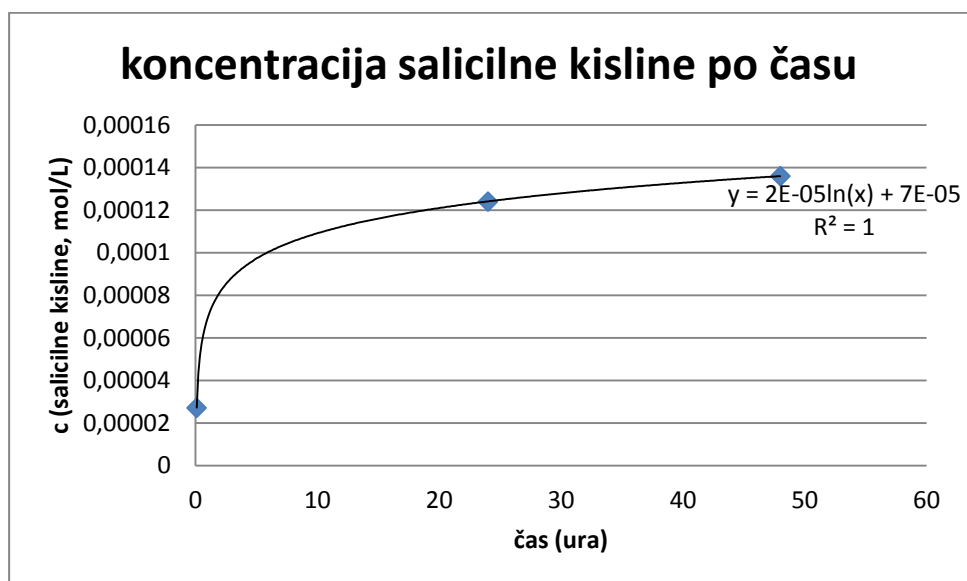
Ta koncentracija velja alikvot filtrata, preračunano na celotno raztopino polimera (20 mL) je koncentracija $8,44 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Preračunano na 1g polimera je to: $8,44 \times 10^{-5} \text{ mol/L} : 3,11 = 2,71 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Preglednica 15: Izračun salicilne kisline, ki je nastala kot produkt hidrolize Aspirina po 5 min, 24 urah, 48 urah

Vzorec raztopine polimera z Aspirinom®	Absorbanca	Koncentracija (salicilne kisline) , mol/L, v 3,11 g polimera	Koncentracija (salicilne kisline) , mol/L, v 1g polimera
Po 5 min	0,022	$8,44 \times 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-5}$
Po 24 urah	0,102	$3,92 \times 10^{-4}$	$1,24 \times 10^{-4}$
Po 48 urah	0,110	$4,23 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-4}$

Graf 4: Grafična predstavitev naraščanja koncentracije salicilne kisline, ki je nastala kot produkt hidrolize Aspirina po 5 min, 24 urah, 48 urah



6.5 Izračun deleža Aspirina, ki se je hidroliziral (sprostil iz polimerne osnove), pH=7

Prikazan je en primer izračuna:

$$C=n/V \rightarrow n=c V= 8,44 \times 10^{-5} \times 0,02L=1,69 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

$$m=n M= 1,69 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 138,12g/mol= 2,33 \times 10^{-4}g$$

To je masa v 3,11 g polimera.

Če predpostavimo, da smo imeli homogeno zmes, v celotni masi polimer a to pomeni: $1,25 \times 10^{-3} \text{ g}$

$$\text{Delež hidroliziranega Aspirina} = 1,25 \times 10^{-3} \text{ g} / 2,23 \times 10^{-1}g = 0,00559 \text{ (0.56\%)}$$

Preglednica 16: Delež hidroliziranega Aspirina pri pH=7

Vzorec raztopine polimera z Aspirinom®	Koncentracija (salicilne kisline), mol/L, v 3,11 g polimera	Množina salicilne kisline (mol)	Masa hidrolizirane salicilne kisline	Delež, ki ga predstavlja salicilna kislina (%)
Po 5 min	$8,44 \times 10^{-5}$	$1,69 \times 10^{-5}$ mol	$3,87 \times 10^{-3}$ g	0,56%
Po 24 urah	$3,92 \times 10^{-4}$	$7,84 \times 10^{-5}$ mol	$5,78 \times 10^{-3}$ g	2,6%
Po 48 urah	$4,23 \times 10^{-4}$	$8,46 \times 10^{-5}$ mol	$6,24 \times 10^{-3}$ g	2,8%

Celoten postopek smo ponovili še za primer, ki simulira okolje, v katerem je prisotna želodčna kislina (HCl s $\text{pH} \approx 1$). Vsi ostali parametri so ostali nespremenjeni (sobna temperatura, vrsta biopolimera).

Masa vzorca polimera: $(2,30 \pm 0,0001)$ g.

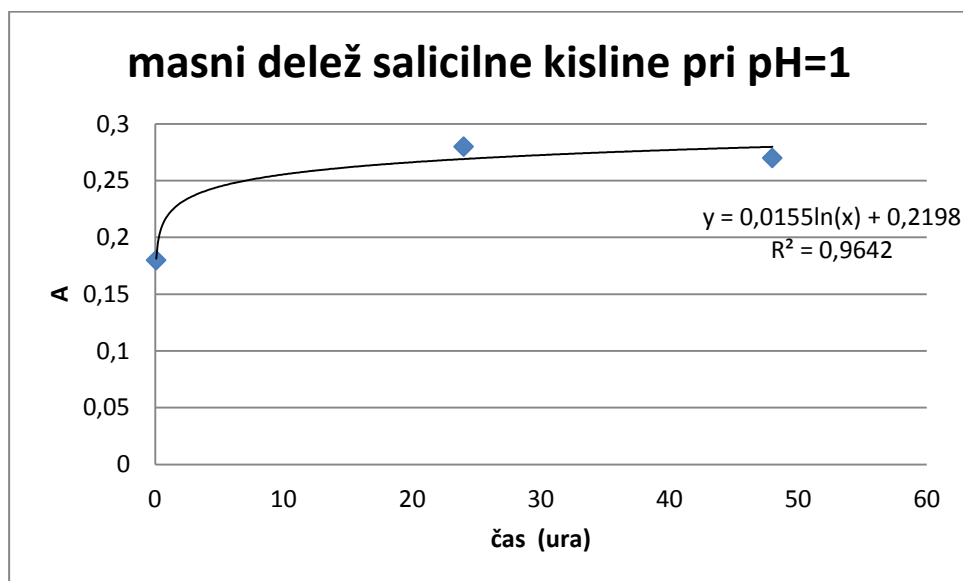
6.6 Hitrost hidrolize pri pH=1

Preglednica 17: Spreminjanje absorbanca v času 48 ur (hidroliza biopolimera z vključenim Aspirinom), pH=1

Vzorec raztopine polimera z Aspirinom®	Absorbanca
Po 5 min	0,18
Po 24 urah	0,28
Po 48 urah	0.27

Takoj opazimo, da je hidroliza v kislem okolju vodne raztopine klorovodikove kisline izjemno hitra, v primerjavi z vodno raztopino iz prvega dela poskusa pri pH=7.

Graf 5: Spreminjanje absorbance v času 48 ur (hidroliza biopolimera z vključenim Aspirinom), pH=1



Preglednica 18: Izračun salicilne kisline, ki je nastala kot produkt hidrolize Aspirina po 5 min, 24 urah, 48 urah, pH=1

Vzorec raztopine polimera z dodanim Aspirinom®	Absorbanca	Koncentracija (salicilne kisline) , mol/L, v 2.30 g polimera	Koncentracija (salicilne kisline) , mol/L, v 1g polimera
Po 5 min	0,18	$6,91 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$
Po 24 urah	0,28	$1,08 \times 10^{-3}$	$4,68 \times 10^{-4}$
Po 48 urah	0.27	$1,04 \times 10^{-3}$	$4,51 \times 10^{-4}$

Primer izračuna:

$$y=520,82x \quad Y=0,18$$

$$X=c(\text{salicilne kisline})=3,46 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

Ta koncentracija velja alikvot filtrata, preračunano na celotno raztopino polimera (20 mL) je koncentracija $6,91 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Preračunano na 1g polimera je to: $6,91 \times 10^{-4} \text{ mol/L} : 2,30 = 3,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

6.7 Izračun deleža Aspirina, ki se je hidroliziral (sprostil iz polimerne osnove), pH=1

Prikazan je en primer izračuna:

$$C=n/V \rightarrow n=c V= 6,91 \times 10^{-4} \times 0,02L=1,38 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$m=n M= 1,69 \times 10^{-6} \text{ mol} \times 138,12\text{g/mol}= 1,90 \times 10^{-3}\text{g}$$

To je masa v 2,30 g polimera.

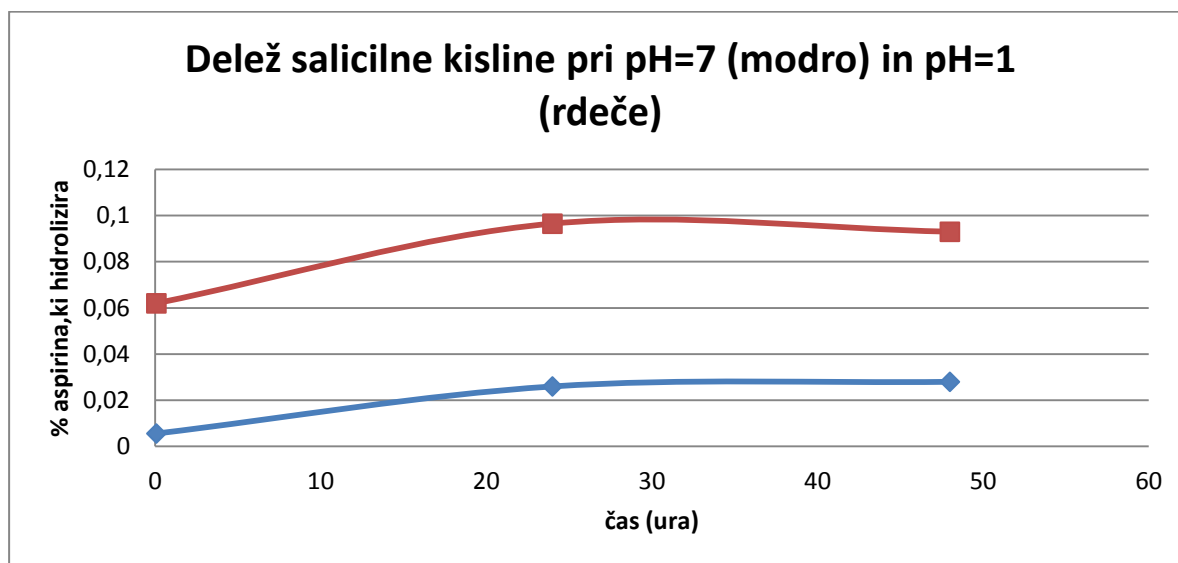
Če predpostavimo, da smo imeli homogeno zmes, v celotni masi polimer a to pomeni: $1,38 \times 10^{-2} \text{ g}$

$$\text{Delež hidroliziranega Aspirina} = 1,38 \times 10^{-2} \text{ g} / 2,23 \times 10^{-1} \text{ g} = 0,0617 \text{ (6,2\%)}$$

Preglednica 19: Delež hidroliziranega Aspirina pri pH=1

Vzorec raztopine polimera z dodanim Aspirinom®	Koncentracija (salicilne kisline) , mol/L, v 3,11 g polimera	Množina salicilne kisline (mol)	Masa hidrolizirane salicilne kisline	Delež ,ki ga predstavlja salicilna kislina (%)
Po 5 min	$6,91 \times 10^{-4}$	$1,38 \times 10^{-5} \text{ mol}$	$1,38 \times 10^{-2} \text{ g}$	6,20%
Po 24 urah	$1,08 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-5} \text{ mol}$	$2,15 \times 10^{-2} \text{ g}$	9,65%
Po 48 urah	$1,04 \times 10^{-3}$	$2,08 \times 10^{-5} \text{ mol}$	$2,07 \times 10^{-2} \text{ g}$	9,30%

Graf 6: Primerjava deleža Aspirina, ki je hidroliziral pri pH=1 in pH=7.



Po podatkih podjetja Sigma-Aldrich⁶ je pKa vrednost acetilsalicilne kisline (Aspirin) 3,5.

Če to preračunamo v K_a , je 10^{-pK_a} , torej $10^{-3,5} = 3,16 \times 10^{-4}$.

Ker je hidroliza Aspirina ravnotežna reakcija predpostavimo, da je koncentracija salicilne kisline in očetne kisline pri $T=25^\circ\text{C}$ enaka. Iz dobljenih podatkov lahko izračunamo kolkšna je bila hidroliza Aspirina v danih pogojih.

6.8 Stopnja hidrolize Aspirina pri pH=7

Po 5 min: $\frac{[\text{Salicilna kislina}][\text{očetna kislina}]}{[\text{aspirin}]} = K_a$

$$\frac{0,0000844^2}{[\text{aspirin}]} = 3,16 \times 10^{-4}$$

$$\underline{c(\text{aspirin}) = 2,25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}}$$

⁶ Vir: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a5376?lang=en®ion=SI>, 2.2.2013

Po 48 urah: $\frac{0,000423^2}{[\text{aspirin}]} = 3,16 \times 10^{-4}$

c(aspirin) = 5,66 x 10⁻⁴ mol/L

Začetna koncentracija aspirina v polimeru je bila:

$$\frac{0,233g}{180,6g/mol \times 0,02L} = 0,065mol/L$$

Stopnja hidrolize:

a) Po 5 min: $\frac{0,0000225 \times 100}{0,065} = 0,034\%$

b) Po 48 urah: $\frac{0,000566}{0,065} \times 100 = 0,87\%$

6.9 Stopnja hidrolize Aspirina pri pH=1

Po 5 minutah: $\frac{[\text{Salicilna kislina}][\text{ocetna kislina}]}{[\text{aspirin}]} = K_a$

$$\frac{0,000691^2}{[\text{aspirin}]} = 3,16 \times 10^{-4}$$

c(aspirin) = 1,15 x 10⁻³ mol/L

po 48 urah: $\frac{0,00104^2}{[\text{aspirin}]} = 3,16 \times 10^{-4}$

c(aspirin) = 3,4 x 10⁻³ mol/L

Stopnja hidrolize:

c) Po 5 min: $\frac{0,00115 \times 100}{0,065} = 1,8\%$

d) Po 48 urah: $\frac{0,0034}{0,065} \times 100 = 5,23\%$

7 RAZPRAVA

1. del poskusov

V prvem delu eksperimentalnega dela smo preučevali stopnjo polimerizacije dveh vrst jedilnega koruznega škroba in čistega škroba (Sigma- Aldrich), pri čemer smo dodajali različna mehčala (glicerol, citronska kislina, askorbinsko kislino in ureo). Opazna je bila velika razlika med uporabo jedilnega škroba (85% čistoče) ter čistega škroba (99,9%). V primeru jedilnega škroba so bili izkoristki sinteze bistveno višji, kot pri čistem škrobu in tudi potek polimerizacije povsem drugače. Pri čistem škrobu je bilo potrebo vsaj 20 min intenzivnega segrevanja in mešanja pri čemer je nastal steklast polimer. Pri jedilnem škrobu je polimerizacija potekla znotraj 5. min. Z vidika elastičnosti (kompaktne strukture) smo kot najbolj ustrezen polimer določili polimer iz jedilnega škroba z mehčalom glicerolom (oznaka KŠ1-G). Ker se je v primeru dodatka treh kapljic (cca. 1,5 mL) vodne raztopine zelenega živilskega barvila Meta stopnja elastičnosti še povečala, smo v nadaljevanju preučili možnost obarvanja polimernih materialov na osnovi škroba z znanimi živilskimi barvili. Posamezna barvila so strukturno različna, zato smo dobili zelo različne končne mase polimerov. Razlike v masi pojasnjujemo s sposobnostjo polimera, da v sebi, tudi po določenem času sušenja, še vedno zadrži vodo. Hidrofilnost polimernih verig to omogoča, bistveno pa so k temu pripomogli tudi različni pigmenti, ki so nabrekanje škrobnih zrn lahko povečali ali zmanjšali. Ta del eksperimentalnega dela je pokazal, da je med vsemi preizkušenimi barvili še najbolj ustrezen ekstrakt rdečega zelja, ki je najmanj zdravstveno škodljiv, vendar ne daje elastičnih struktur, ki so zelene za nosilec zobne ščetke. Z vidika elastičnosti so bili najbolj primerni polimeri obarvani s pigmentom pod imenom Višnja (temno rdeči polimeri), ter zelenim pigmentom mete, ki pa se žal izpirajo.

V prvem delu poskusov je bilo ugotovljeno, da je polimere na osnovi škroba boljše sušiti na sobni temperaturi, saj ohranijo elastičnost, prožnost in so bolj homogene zgradbe. Najboljši rezultat je bil dosežen s kombinacijo KŠ1-G in KŠ1 –G MB.

Zamenjava jedilnega škroba (KŠ2) ni prinesla opaznih razlik na videzu in zunanji strukturi sintetiziranih polimerov, vendar smo zaradi natančnejšega opisa proizvajalca, v nadaljevanju uporabljali jedilni (koruzni) škrob pod oznako KŠ1. Preučevanje fizikalnih lastnosti sintetiziranih termoplastičnih polimerov je pokazalo, da obe vrsti škroba nista identični in se razlikujeta v tistih 15% dodatkov, ki jih proizvajalci ne definirajo.

Zaključki prvega dela.

Za sintezo biopolimera na osnovi koruznega škroba je najbolj primeren mehčalec glicerol (KŠ1-G), ki mu sledi citronska kislina. Za barvanje biopolimerov lahko uporabimo živilska barvila, vendar le ta vplivajo na stopnjo želiranja polimera ter njihovo elastičnost in se izpirajo pri daljši izpostavljenosti.

2. del poskusov – lastnosti sintetiziranih polimerov

Najprej smo preučili stopnjo izpiranja dodanih barvil (pigmenti, ki se uporabljajo v živilski industriji). Ugotovili smo, da polimeri obarvani z zelenim živilskim barvilom in modrim živilskim barvilom, niso primerni za barvanje polimernih struktur, saj se prehitro izlužijo iz strukture polimera. Po 24 urah namakanja polimerov v vodnih raztopinah različnih pH-jev smo opazili, da le polimer KŠ1-G, obarvan z ekstraktom rdečega zelja v kislem okolju (pH=4) ni razpadel in se ni razbarval. V nevtralnem okolju, je bilo najmanj sprememb opaziti na polimeru KŠ1-G obarvanem z ekstraktom iz rdečega zelja, pri čemer smo po 24 urah opazili delno razbarvanje. Podobno velja tudi za bazično okolje.

Ker se je do te točke preiskovanja polimerov izkazalo, da imajo polimeri zgrajeni iz KŠ1-G, z dodanim 1,5 mL ekstrakta barvila na izhodiščno maso polimera, opisano v proceduri pod 3.1., najbolj elastično in obenem trdno strukturo, ki je odporna tako na kisel, kot nevtralen in bazičen pH (vrednosti v razponu od 4,0-9,5) je ta kombinacija bila izbrana za sintezo držala zobne ščetke. Za držalo ščetke je vsekakor bolj primeren kemijsko čist škrob (ČŠ- G), saj je stopnja želiranja pri njem zanemarljivo majhna.

Polimer na osnovi čistega koruznega škroba se lahko v ustih tudi delno razgradi (prisotnost amilaze) , vendar je povsem neškodljiv za uporabnike, saj razpade v glukozne enote. Hitrost encimske hidrolize je zagotovo višja kot hitrost nekatalizirane reakcije (dodano je bila 5% očetna kislina), vendar ne smemo zanemariti dejstva, da nabrekanje škrobnih zrn zmanjša difuzijo in s tem dostopnost različnim dejavnikom, da prodrejo v notranjost polimera.

Sledil je pregled izgube vode iz strukture polimerov, ki so imeli vgrajeno 0,223 g Aspirina (sušenje polimera na zraku). V prvih 24 urah se skupna masa KŠ- G(ASA) zmanjša od 32- 40%, predvsem na račun vode izgube vode. Slednjega ne opazimo pri polimerih iz čistega škroba (ČŠ-G(ASA)), kjer je izguba vode 4% ali manj. Izjemno počasi pa vodo oddaja polimer narejen iz jabolčnega pektina. Ta

ohrani vlažnost zelo dolgo, vendar izjemno želira in je neuporaben za ogrodje kakršnega koli izdelka, ki mora imeti določeno trdnost.

Preizkus upogibne trdnosti polimer ČŠ-G(ASA) in KŠ1-G(ASA) je bil zaradi pomanjkanja ustrezne opreme le ocenjen. Dobljene vrednosti termoplastični škrob uvrščajo v razred upogibne trdnosti, ki jo dosega polietilen (Avsec, 2011, str. 27). Večina zobnih ščetk, ki so trenutno na trgu je narejenih iz polietilena, acetatne celuloze, ali različnih recikliranih materialov (običajno celuloze). Pri otroških zobnih ščetkah se posebej poudarja, da v polimernem materialu ni bisfenola A, ki je potencialni karcinogen. Ščetine večine zobnih ščetk so iz t.i. kirurškega najlona.

Gostota sintetiziranih termoplastičnih polimerov se giblje med 690g/l (ČŠ-G) do 1100 g/LKŠ1-G), kar ustreza gostotam polimetil metakrilatov (PMMA) (1160 g/L) in polietilenu, PE, (910g/L)⁷. Tudi s tega zornega kota je termoplastični škrob primerna osnova za držalo zobnih ščetk. Termoplastični polimer ČŠ-G ne gori s pravim plamenom; pri povišanih temperaturah se obnaša kot duroplast. Polimeri KŠ1-G gorijo z oranžnim plamenom in so glede tega bolj podobni termoplastom.

ČŠ-G polimer je odporen proti vsem preučevanim topilom (voda, etanol, heksan in aceton). KŠ-G v vodi nabreka, v acetonu opazimo »skrčitev« in otrditev.

3. del – biopolimeri kot nosilci terapevtske učinkovine

V tem delu smo preučevali le polimer tipa KŠ1-G(ASA). Izbrali smo ga na osnovi predhodnih poskusov. Polimer v vodi želira, vendar ohranja kompaktno polimerno strukturo. Meritve pH vodnih raztopin teh polimerov so pokazale pH vrednost 5,5, kar pomeni, da del polimera, ki je sposoben kisle reakcije, očitno prehaja v topilo. Ker je bila 5% očetna kislina v vseh primerih dodana kot katalizator za zamrežitev (in vedno v enakih količinah), bi na razlike lahko vplivala hidroliza Aspirina, ki v kislem okolju delno razpade na salicilno kislino in preostanek etanojske kisline. Da bi preverili našo hipotezo smo si najprej pripravili standardne raztopine salicilne kisline, ki v kombinaciji z Fe(III) tvori rdeče-vijolično obarvane komplekse. Na tej osnovi smo pripravili umeritveno krivuljo in skozi 48 ur spremljali spremembo koncentracije salicilne kisline v vzorcu termoplastičnega polimera KŠ1-G(ASA). Ugotovljeno je bilo, da je sproščanje salicilne kisline v prvih urah, zaradi površinske erozije polimera, ki

⁷ Vir: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Gostota>, povzeto 5.2. 2013

je posledica hidrolize, najvišje, sledi bistveno zmanjšanje hitrosti kemijske reakcije. Iz znanih mas acetyl-salicilne kisline, ki smo jih dodali pri sintezi polimera (0,2230g), smo preko enačbe za umeritveno premico izračunali delež salicilne kisline, ki je hidroliziral v polimeru. Vrednosti pri pH=7 so se gibale od 0,56% (prvih pet minut) do 2,8% v 48 urah. Očitno je nabrekanje polimera zaustavilo difuzijo salicilne kisline skozi polimerne verige škrobnih zrn. Poskus smo ponovili z vodno raztopino pH=1 (simulacija želodčne kisline) in izračunali, da se pri teh pogojih delež salicilne kisline v raztopini, po 48 urah poveča, na 9,30%, kar je skoraj 4x višja hitrost reakcije kot pri pH=7. Na tej osnovi smo izračunali celoten delež hidroliziranega Aspirina. Začetna koncentracija v termoplastičnem polimeru je bila 0,065mol/L, po 48 urah je pri pH=7 hidroliziralo 0,87% Aspirina in pri pH=1, 5,23% Aspirina.

8 ZAKLJUČKI

Cilj inovacijskega predloga je bil razviti termoplastični škrob, ki ima naslednje lastnosti:

6. primerno trdoto in elastičnost .
7. biokompatibilnost v primeru zaužitja
8. odpornost na encimske reakcije (in vivo).
9. ga lahko uporabimo kot material prvih zobnih ščetk..
10. ga lahko uporabimo kot sredstvo za prenos terapevtskih sredstev.

Žal poskusov z amilazo nismo uspeli dokončati do te mere, da bi rezultate lahko vključili v nalogo. Na osnovi dobljenih rezultatov zaključujemo, da je termoplastičen škrob, pridobljen na način, kot je to prikazano v tej nalogi, primeren material za držalo prvih zobnih ščetk.. Polimer tipa ČŠ-G ima primerno kristalinično strukturo, upogibno trdnost, je lahek in se ne raztaplja v polarnih, nizko polarnih ter nepolarnih topilih. Pri površinski hidrolizi (v primeru, da otroci ščetko grizljajo in sesajo), bi lahko prišlo do površinske erozije in s tem hidrolize termoplastičnega škroba ali poškodbe materiala, vendar so razgradni produkti termoplastičnega škroba povsem neškodljivi. Polimer je narejen iz obnovljivih virov in tudi z vidika varovanja okolja dobra izbira. Zavedamo pa se, da so raziskave opravljene v šol. laboratoriju, na majhnem številu vzorcev in z omejenimi analitskimi tehnikami (pregled zgradbe sintetiziranih polimerov), premalo, da bi že jutri iz termoplastičnega škroba lahko začeli izdelovati držala

zobnih ščetk. Vendar menimo, da smo nanizali dovolj dokazov, da je termoplastični škrob (čisti škrob) lahko primeren material za izdelavo otroških zobnih ščetk. S tem smo prvo hipotezo potrdili.

Termoplastični škrob smo preizkusili tudi kot material primeren za dostavo/prenos terapevtskih učinkovin. Za potrebe naše raziskave smo kot terapevtsko učinkovino izbrali Aspirin. Ugotovljeno je bilo, da polimer tipa KŠ1-G lahko tudi v ekstremnih pogojih ($\text{pH}=1$) v sebi lahko zadrži do 90% in več odstotkov Aspirina, kar pomeni, da bi polimeri tega tipa lahko bili primerni za počasno in dolgotrajno sproščanje zdravilnih učinkovin. Ker jih lahko zanimivo oblikujemo in obarvamo, in ker se pri njihovi razgradnji ne sproščajo škodljive snovi, bi lahko bili primerni tudi za malčke. S tem smo potrdili drugo hipotezo.



Slika 7: Zvezdica termoplastičnega polimera na osnovi pektina z dodanim Aspirinom®.

Tretja hipoteza pravi, da je v primeru hidrolize termoplastičnega škroba erozija površinska, zato je sproščanje terapevtskih snovi počasno in enakomerno. Tudi to hipotezo smo potrdili. Žal zaradi stiske s časom nismo potrdili ali ovrgli 4. hipoteze, ki pravi, da je erozija sintetiziranega polimera v primeru encimske razgradnje notranja.

Tudi zadnjo hipotezo, ki pravi, da je hidroliza biopolimera na osnovi koruznega škroba hitrejša ob dodatku katalizatorja (npr. kisline), smo preko poskusa z Aspirinom potrdili. Že majhne spremembe dodatkov (npr. različnih barvil), so spremenile zunanji videz in lastnosti polimera, zato smo s tem potrdili tudi 6. hipotezo.

Inovacijski predlog – uporaba termoplastičnega škroba v vsakdanjem življenju (zobne ščetke in kot nosilce za dostavo zdravil) je bila zanimiva izkušnja, za katero velja, da se je z vsako novo serijo

poskusov odpira vedno več vprašanj in idej za nadaljevanje raziskav, kot . Vsekakor bo prva naslednja raziskav na tem področju – encimska hidroliza termoplastičnega škroba.

9 VIRI IN LITERATURA

Literatura:

- Avérous, L., Pollet, E. (2012). Environmental Silicate Nano-Biocomposites. London: Springer-Verlag.
- Avérous, L., Pollet, E. (2009). Biodegradable Polymers. Strasbourg: University of Strasbourg.
- Avérous, L., Moro, L., Dole, P., Fringant, C. (2000). Properties of thermoplastic blends: starch-polycaprolactone. *Polymer* 41(11):4157–4167
- Avsec, U. (2011). Razumevanje tehniških pojmov kot sta trdota in trdnost. Diplomsko delo, PF UM
- Batycky, RP. , Hanes, J., Langer, R., Edwards, DA. (1997). A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. Edmonton: University of Alberta.
- Cergol, L. (2011). Sinteza kopolimerov d,l-laktida in trimetilenkarbonata ter. izdelava mikro in nanodelcev. Diplomsko delo, FF UL
- Cooke, D., Gidley, M.J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. Oxford: Pergamon.
- Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. (2002). Scaffold design for tissue engineering. Tokio: University of Tokyo.
- Dolenc, D. (2010). Kemija za gimnazije 3. Ljubljana: DZS.
- Qiu, L. K., Bae, Y. H. (2006). Polymer architecture and drug delivery. Salt Lake City: University of Utah
- Heller, J., Barr, J., Ng, S. Y., Shen, H. R., Schwach-Abdellaoui, K., Emmahl, S., Rothen-Weinhold, A., Gurny, R. (2000). Poly(ortho esters) - their development and some recent applications. Redwood City: Eur J Pharm Biopharm.
- Hayashi, A., Kinoshita, K., Miyake, Y., Cho, C.H. (1981) Conformation of amylose in solution. Edinburg: University of Edinburgh
- Ikada, Y., Tsuji, H. (2000). Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. Toyohashi: University of Technology.
- Keuc, Z. (2011). Laboratorijske vaje – interno gradivo, II. gimnazija Maribor
- Kornhauser, A. (1996). Organska kemija III. Ljubljana: DZS.
- Kržan, A. (2012). Biorazgradljivi polimeri in plastika. Ljubljana: Kemijski inštitut. Pridobljeno na: http://www.plastice.org/fileadmin/files/PLASTICE_MALI_FAJL_za_WWW.pdf
(uporabljeno 4.1.2013)
- Kržan, A. (2012). Bioplastika. Ljubljana: Kemijski inštitut. Pridobljeno na: http://www.plastice.org/fileadmin/files/Bioplastika_in_njeno_mesto_Andrej_Krzan.pdf
(uporabljeno 4.1.2013)

- Šprajcar, M., Horvat, P., Kržan, A. (2012). Biopolimeri in bioplastika plastika skladna z naravo. Informacijsko – izobraževalno gradivo za profesorje in laborante kemije na osnovnih in srednjih šolah. Ljubljana: Kemijski inštitut.
Pridobljeno na: http://www.plastice.org/fileadmin/files/PLASTICE_MALI_FAJL_za_WWW.pdf (uporabljeno 4.1.2013)
- Polimerni materiali (učno gradivo). Šolski center Novo mesto. Pridobljeno na: http://www.sc-nm.si/szks/file/open/306_ccf315eb05e1/POLIMERNI%20MATERIALI-u%C4%8Dno%20gradivo.pdf (uporabljeno 4.1.2013)
- Payne, L. G., Jenkins, S. A., Andrianov, A., Roberts, B. E. (1995). Water-soluble phosphazene polymers for parenteral and mucosal vaccine delivery. Cambridge: Virus Research Institute.
- Sabir, M. I., Xiaoxue, X., Li, L. (2009). A review on biodegradable polymeric material for bone tissue engineering applications. Harbin: Journal of Materials Science.
- Shieh, L., Tamada, J., Chen, I., Pang, J., Domb, A., Langer, R. (1994). Erosion of a new family of biodegradable polyanhydrides. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology.
- Shive, M. S., Anderson, J. M. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Cleveland: Institute of Pathology and Department of Biomedical Engineering.
- Shogren, R. L. (1992). Effect of moisture content on the melting and subsequent physical aging of cornstarch. Peoria: Agricultural Research Service.
- Tormala, P., Pohjonen, T., Rokkanen, P. (1998). Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. Tampere: Tampere University of Technology
- Vroman, I., Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. Materials. Biodegradability of Materials
- Zhu, G., Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of proteins encapsulated in cylindrical poly (lactide-co-glycolide) implants: mechanism of stabilization by basic additives. Pharm Res. Columbus: The Ohio State University
- Zhu, G., Mallery, S.R., Schwendeman, S. P. (2000). Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide). Columbus: The Ohio State University

Internetni viri:

- Acetylsalicylic acid. Pridobljeno na: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a5376?lang=en®ion=SI> (uporabljeno 2.2.2013)
- Aktualna vprašanja. Pridobljeno na: http://www.zobozdravstvo.com/aktualna_vprasanja.html (uporabljeno 4.1.2013)
- Gostota. Pridobljeno na: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Gostota> (uporabljeno 5.2. 2013)
- Obnovljivi viri. Pridobljeno na: <http://www.polimat.si/1/podrocja-raziskovanja/obnovljivi-viri.aspx> (uporabljeno 4.1.2013)

- Odpoklic otroške zobne ščetke Elmex. Pridobljeno na: http://www.ringaraja.net/clanek/odpoklic-otroske-zobne-scetke-elmex_5457.html (uporabljeno 4.1.2013)
- O zobeh in higieni. Pridobljeno na: <http://www.zevnik.eu/index.php?PageID=284> (uporabljeno 03.02.2013)
- Polimeri. Pridobljeno na: <http://www.kemija.org/index.php/kemija-mainmenu-38/24-kemijacat/22-polimeri> (uporabljeno 4.1.2013)
- Rahne, L. (2010). Moji beli zobki. Pridobljeno na: http://www.ringaraja.net/clanek/moji-beli-zobki_1418.html (uporabljeno 3.2.2013)
- The good, the bad and the ugly about biodegradable plastics. Pridobljeno na: <http://www.greendiary.com/good-bad-ugly-biodegradable-plastics.html> (uporabljeno 4.1.2013)
- Umivanje zobkov. Pridobljeno na: <http://www.zevnik.eu/index.php?PageID=273> (uporabljeno 3.2.2013)
- Večplastni medicinski materiali. Pridobljeno na: <http://www.polimat.si/1/podrocja-raziskovanja/polimeri-za-zdravstveno-varstvo-in-medicino.aspx> (uporabljeno 4.1.2013)
- Zakon o splošni varnosti proizvodov (Ur.l. RS št. 101/2003). Pridobljeno na: http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r07/predpis_ZAKO3707.html (uporabljeno 4.1.2013)

Viri slik:

Slika 1: Dolenc, 2010, str. 179

Slika 2: Avérous, L., Pollet, E., 2012 str. 17

Slika 3: Cergol, 2011 str.34

Slika 4: Avsec, 2011, str. 26

Slika 5: Posneto pri eksperimentalnem delu.

Slika 6: Posneto pri eksperimentalnem delu.

Slika 7: Posneto pri eksperimentalnem delu.