



Politechnika Wroclawska

---

**DZIEDZINA:** Nauki inżynieryjno-technicznych

**DYSCYPLINA:** Inżynieria chemiczna

## ROZPRAWA DOKTORSKA

**Modyfikacja materiałów polimerowych przy użyciu  
wysokociśnieniowego ditlenku węgla w celu uzyskania  
właściwości antybakteryjnych i antybiofilmowych**

Mgr inż. Mariusz Nowak

Promotor

prof. dr hab. Irena Žižović

Słowa kluczowe: Nadkrytyczny ditlenek węgla, modyfikacja polimerów, impregnacja nadkrytyczna, szczepienie nadkrytyczne, właściwości antybakteryjne, właściwości antybiofilmowe

WROCŁAW 2024

## Abstrakt

W niniejszej rozprawie doktorskiej badano metody otrzymywania nowatorskich materiałów funkcjonalnych o właściwościach antybakteryjnych i antybiofilmowych. W pracy wykorzystywano nadkrytyczny ditlenek węgla jako rozpuszczalnik w procesach impregnacji nadkrytycznej i szczepienia w fazie nadkrytycznej.

Impregnację nadkrytyczną karwakrolem membran poliamidowych przeprowadzono w warunkach procesowych 40°C ciśnieniach 10, 15 i 20 MPa i w czasie 1-6 godziny. Zbadano potencjałe zastosowanie membran z ładunkiem karwakrolu jako filtr i źródło substancji antybakteryjnej w operacjach na otwartych ranach chirurgicznych. Określono uwalnianie karwakrolu do ditlenku węgla, który jest stosowany przy insuflacji ran chirurgicznych. Dodatkowo badania SEM-FIB wykazały, że załadowanie karwakrolu do 43% mas., wpływa w niewielkim stopniu na funkcjonalność membrany. Stworzono modelu otwartej jamy klatki piersiowej w której membrana z 30-34% mas. ładunkiem karwakrolu emitowała substancję aktywną do modelu. Badania mikrobiologiczne wykazały 27% redukcję poziomu zanieczyszczenia bakteryjnego w porównaniu do standardowych membran. Impregnację nadkrytyczną karwakrolem membran z octanu celulozy przeprowadzono w warunkach procesowych 40°C ciśnieniach 15 i 20 MPa i w czasie 0,5-3 godziny. Zaimpregnowane karwakrolem membrany do mikrofiltracji z octanu celulozy poddano testom filtracji krzyżowej w celu oceny wpływu ładunku substancji aktywnej na właściwości filtracyjne membrany. Membrany załadowane w maksymalnie 25% zachowywały pierwotną strukturę porowatą. Badania przy pomocy cytometrii przepływowej wpływu karwakrolu na depozycję bakterii na powierzchni membran pod filtracji krzyżowej wykazały spadek osadzania *S. aureus* z  $\sim 10^7$  do  $\sim 10^5$  bakterii/(cm<sup>2</sup>·mL). Membrany zawierające 20% i 25% karwakrolu charakteryzowały się najwyższym strumieniem permeatu i mniejszą liczbą osadzonych bakterii. Membrana z 25% karwakrolem miała najwięcej martwych osadzonych bakterii (42%). Modelowanie wykazało, że mechanizm blokowania porów zmieniał się wraz ze wzrostem zawartości karwakrolu, przechodząc od filtracji plackowej przez pośrednie do standardowego i całkowitego modelu blokowania.

Drugą badaną metodą modyfikacji materiałów było szczepienie w fazie nadkrytycznej polegające na chemicznym przyłączeniu substancji aktywnej do struktury polimeru. W tym celu zsyntezowano trzy czwartorzędowe związki amoniowe: bromek N-(2-hydroksyetylo)-N,N-dimetylundekan-1-aminu (QAC 1), bromek N-(11-hydroksyundekanylo)-N,N-dimetylotetradekan-1-aminowego (QAC 2) i bromek N-(11-hydroksyundekanylo)-N,N-dimetylooktan-1-aminu (QAC 3). QAC 1 i QAC 2 zaszczepiono w dwuetapowej reakcji do octanu celulozy z wykorzystaniem łącznika-linkera diizocyjanianu heksametylenu w warunkach procesowych 30 MPa i 70 MPa. W identycznym procesie przyłączono QAC 2 i QAC 3 do struktury blendów skrobiowo-chitozanowych. Badania zwilżalności powierzchni materiałów wykazały wzrost hydrofobowości po procesie szczepienia. Badano potrzebny czas na przereagowanie kluczowych dla procesu grup funkcyjnych. Dalsza charakteryzacja zaszczepionego octanu celulozy wykazała spadek krystaliczności, obecność chropowatej powierzchni i zachowanie pierwotnej zwartej struktury polimerowej. Wykazano również, że modyfikacja płynem nadkrytycznym nastąpiła w całej objętości polimeru. Testy mikrobiologiczne wykazały brak możliwości adhezji *S. aureus*, MRSA, *E. coli* i *S. Enteritidis* do materiału octanu celulozy zaszczepionego QAC 2.

This dissertation investigated methods for obtaining novel functional materials with antibacterial and antibiofilm properties. In this work, supercritical carbon dioxide was used as a solvent in supercritical impregnation and supercritical grafting processes.

Supercritical impregnation with carvacrol of polyamide membranes was carried out under process conditions of 40°C pressures of 10, 15, and 20 MPa for 1-6 hours. The potential use of carvacrol-loaded membranes as a filter and a source of an antibacterial agent in open surgical wounds was investigated. The release of carvacrol into carbon dioxide, which is used in surgical wound insufflation was determined. In addition, SEM-FIB studies showed that loading carvacrol up to 43 wt% had a minor effect on the functionality of the membrane. An open chest cavity model was created in which a membrane with 30-34 wt% carvacrol loading emitted the active substance into the model. Microbiological tests showed a 27% reduction in bacterial contamination compared to standard membranes. Supercritical carvacrol impregnation of cellulose acetate membranes was carried out at process conditions of 40°C, pressures of 15 and 20 MPa, and for 0.5-3 hours. Carvacrol-impregnated cellulose acetate microfiltration membranes were tested in cross-filtration to evaluate the effect of active substance loading on the membrane's filtration properties. Membranes loaded at a maximum of 25% retained their original porous structure. Flow cytometry studies of the effect of carvacrol on bacterial deposition on the membrane surface during cross-filtration showed a decrease in *S. aureus* deposition from  $\sim 10^7$  to  $\sim 10^5$  bacteria/(cm<sup>2</sup>·mL). Membranes containing 20% and 25% carvacrol had the highest permeate flux and the smallest number of deposited bacteria. The membrane with 25% carvacrol had the most dead bacteria (42%). Modeling showed that the pore-blocking mechanism changed with increasing carvacrol content, moving from cake filtration through intermediate to standard and total blocking models.

The second method of material modification studied was grafting in the supercritical phase. The process involves chemical attachment of the active substance to the polymer structure. For this purpose, three quaternary ammonium compounds were synthesized: N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylundecan-1-amine bromide (QAC 1), N-(11-hydroxyundecanyl)-N,N-dimethyltetradecan-1-amine bromide (QAC 2) and N-(11-hydroxyundecanyl)-N,N-dimethylundecan-1-amine bromide (QAC 3). QAC 1 and QAC 2 were grafted to cellulose acetate in a two-step reaction to cellulose acetate using hexamethylene diisocyanate linker at conditions of 30 MPa and 70 MPa. In an similar process, QAC 2 and QAC 3 were attached to the structure of starch-chitosan blends. Surface wettability studies of the materials showed an increase in hydrophobicity after the grafting process. The reaction time was investigated. Further characterization of grafted cellulose acetate showed a decrease in crystallinity, the presence of a rugged surface and preservation of the original compact polymer structure. It was also shown that modification using supercritical carbon dioxide occurred throughout the whole polymer volume. Microbiological tests showed the adhesion of *S. aureus*, MRSA, *E. coli* and *S. Enteritidis* to cellulose acetate material grafted with QAC 2 was impossible.

## Podziękowania

Pragnę podziękować mojej promotorkę prof. dr hab. Irenie Žižović za jej prowadzenie, cierpliwość i wszelkie wsparcie podczas trwania studiów doktoranckich. Dziękuję również Marcinowi Tyrce za wsparcie techniczne i merytoryczne w Laboratorium Wysokociśnieniowym.

Pragnę również wyrazić wdzięczność prof. dr hab. inż. Annie Trusek, kierownicze Katedry Inżynierii Bioprocessowej, Mikro i Nanoinżynierii, w której miałem zaszczyt pracować przez ostatnie lata, jak i wszystkim pracownikom Katedry, na których pomoc zawsze mogłem liczyć.

Dziękuję mojej żonie Dominice oraz rodzicom Marii i Dariuszowi Nowak za wsparcie i motywowanie mnie do pracy. Dziękuję też Bogu za Jego łaski, które sprawiły, że doprowadziłem tę pracę do końca.



# Spis treści

Abstrakt .....	1
Podziękowania.....	3
1 Wstęp.....	6
1.1 Biofilm jako wyzwanie we współczesnym świecie .....	6
1.1.1 Cykl powstawania biofilmu .....	6
1.2 Fouling a filtracja krzyżowa.....	7
1.3 Zastosowanie octanu celulozy, poliamidu, skrobi i chitozanu.....	9
1.4 Historia i rozwój technik wysokociśnieniowych .....	12
1.5 Impregnacja materiałów polimerowych metodą konwencjonalną i nadkrytyczną .....	15
1.5.1 Raport literaturowy nt. materiałów uzyskanych z SSI.....	18
1.6 Szczepienie chemiczne jako metoda modyfikacji polimerów .....	20
1.6.1 Szczepienie celulozy, skrobi i chitozanu .....	22
1.6.2 Aplikacja materiałów uzyskanych ze szczepienia chemicznego .....	22
1.7 Cel i znaczenie pracy; hipotezy badawcze.....	25
1.7.1 Określenie głównego celu badawczego.....	25
1.7.2 Wskazanie potencjalnych kontrybucji do literatury naukowej i przemysłowej .....	25
1.8 Przedstawienie zawartości pracy.....	26
2 Część eksperymentalna.....	27
2.1 Materiały .....	27
2.2 Aparatura wysokociśnieniowa .....	28
2.3 Impregnacja nadkrytyczna – metody .....	29
2.3.1 Impregnacja nadkrytyczna karwakrolem.....	30
2.3.2 Filtracja krzyżowa .....	31
2.3.3 Modelowanie matematyczne filtracji krzyżowej.....	32
2.3.4 Uwalnianie karwakrolu z membran do ditlenku węgla w fazie gazowej .....	33
2.3.5 Model komórki piersiowej .....	34
2.3.6 Analiza mikrobiologiczna.....	36
2.4 Reakcje szczepienia w fazie nadkrytycznej - metody .....	38

2.4.1	Synteza czwartorzędowych związków amoniowych.....	38
2.4.2	Produkcja membran nieporowatych z octanu celulozy .....	42
2.4.3	Produkcja membran nieporowatych ze skrobi i chitozanu .....	43
2.4.4	Procedura szczepienia nadkrytycznego .....	43
2.4.5	Badania mikrobiologiczne .....	46
2.5	Charakteryzacja.....	48
3	Rezultaty i wnioski.....	50
3.1	Impregnacja nadkrytyczna membran z poliamidu i octanu celulozy .....	50
3.1.1	Charakteryzacja i aplikacja membran poliamidowych.....	55
3.1.2	Charakteryzacja i aplikacja membran z octanu z octanu celulozy .....	65
3.1.3	Wnioski z badań dotyczących impregnacji nadkrytycznej.....	81
3.2	Szczepienie w fazie nadkrytycznej .....	82
3.2.1	Synteza czwartorzędowych związków amoniowych.....	82
3.2.2	Szczepienie w fazie nadkrytycznej.....	83
3.2.3	Szczepienie w fazie nadkrytycznej octanu celulozy i charakteryzacja otrzymanych materiałów .....	84
3.2.4	Szczepienie w fazie nadkrytycznej blendu skrobiowo-chitozanowego.....	99
3.2.5	Wnioski z badań dotyczących szczepienia w fazie nadkrytycznej.....	103
4	Podsumowanie.....	104
5	Bibliografia.....	106
6	Spis rysunków i zdjęć.....	123
7	Spis tabel .....	128
8	Załącznik .....	128

# 1 Wstęp

## 1.1 Biofilm jako wyzwanie we współczesnym świecie

Biofilm jest definiowany jako wielokomórkowy zbiór mikroorganizmów przyczepionych do powierzchni abiotycznej bądź żywej poprzez samodzielnie wytworzoną matrycę polimerową lub zespół komórek drobnoustrojowych związanych z powierzchnią i otoczonych materiałem składającym się głównie z polisacharydu [1] [2]. Osłona taka sprawia, że biofilm jest chroniony przed szkodliwymi dla niego czynnikami zewnętrznymi, środkami dezynfekcyjnymi, antybiotykami, promieniowaniem UV, wysuszeniem i wysokimi temperaturami [3].

Problem istnienia biofilmu stał się widoczny dla wielu gałęzi technologicznych. Rurociągi przemysłowe, moduły membranowe, systemy klimatyzacji, systemy dystrybucji wody i jednostki lecznicze takie jak szpitale, są podatne na kolonizację przez mikroorganizmy rozwijające się w biofilmach. Narazone są ponadto powierzchnie z tworzyw sztucznych, stali nierdzewnej, drewna i szkła, na których biofilm może zostać stworzony przez większość bakterii chorobotwórczych w tym patogeny. Oprócz tego, problem porostu powierzchni biofilmem jest znany w marynarce [3], [4], [5], [6], [7], [8]. Również są narazone wyroby medyczne z przeznaczeniem wszczepu wewnątrz ciała ludzkiego, gdyż patogenne bakterie mają zdolność przylegania do materiałów takich jak protezy ortopedyczne, stomatologiczne oraz tkankowe, soczewki kontaktowe, szwy chirurgiczne, sztuczne stawy, cewniki i zastawki serca, tworząc na nich trwałe biofilmy [9], [10]. Zakażenia bakteryjne związane z zanieczyszczeniem wszczepionych wyrobów medycznych (MDAI, ang. medical-device associated infections) prowadzi do poważnych powikłań, które często skutkują uszkodzeniem implantu oraz koniecznością interwencji chirurgicznej. W konsekwencji czynnik ten wydłuża i komplikuje leczenie pacjenta [11], [12], [13]. Najbardziej obiecującą strategią walki z biofilmem jest wytwarzanie i projektowanie takich powierzchni polimerów, na których nie będzie możliwe jego tworzenie [10], [14]. Powodem tej strategii jest ogólnie przyjęty konsensus, że skuteczna adhezja bakterii do powierzchni jest pierwszym i wymaganym czynnikiem wytworzenia biofilmu [15].

### 1.1.1 Cykl powstawania biofilmu

Nie jest możliwe powstanie biofilmu bez najważniejszego, pierwszego etapu w cyklu jego powstawania, jakim jest adhezja bakterii do powierzchni. Po pierwszym etapie, w którym mikroorganizmy przyłączają się do powierzchni materiału, następuje rozrost mikroorganizmów, które budują mikrokolonie. W dalszym etapie mikrokolonia rozrasta się, produkując tzw. zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe, które umożliwiają trwalsze przyłączenie się do powierzchni, stabilizują strukturę przestrzenną biofilmu, pozwalają na grupowanie się mikroorganizmów i chronią je przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, tj. obecność tlenu, substancje przeciwdrobnoustrojowe, kationy metali, enzymy, czy nawet odpowiedź układu odpornościowego gospodarza, jeśli biofilm powstaje w żywym organizmie. W jego

dojrzałej strukturze warstwa zewnętrzna jest gotowa do opuszczenia biofilmu. Może to nastąpić aktywnie poprzez pęknięcie wytworzonej zewnątrzkomórkowej struktury polimerowej biofilmu bądź pasywnie przez czynniki fizyczne, np. przepływ cieczy. Uwolnione mikroorganizmy w następstwie rozpoczną nowy cykl powstawania biofilmu [16], [17].

## 1.2 Fouling a filtracja krzyżowa

Osadzanie się niechcianego materiału (czyli tzw. fouling) na membranie jest problemem we wszystkich procesach membranowych, zwłaszcza w procesach odwróconej osmozy (RO *ang. Reverse Osmosis*) i nanofiltracji (NF). Wiele przeprowadzonych badań w celu zrozumienia procesu tworzenia się biofilmu na tych membranach, pomogło w opracowaniu metod czyszczenia tychże membran [18], [19].

Wpływ biofoulingu na proces filtracji jest znaczący, ponieważ obecność niechcianego materiału na powierzchni przegrody filtracyjnej – np. membrany zmniejsza systematycznie wraz ze wzrostem biofilmu jej przepuszczalność. Co więcej, obecność biofilmu przyczynia się do wytrącania węglanu wapnia na membranie na skutek zwiększenia pH. Obecność biofilmu również skutkuje zwiększoną akumulacją cząstek abiotycznych [20], [21].

Mechanizm blokowania membrany był zaprezentowany po raz pierwszy przez Hermansa i Bredeea. Jacques Hermia jako pierwszy w swej pracy dokonał rewizji wszystkich mechanizmów blokujących, tj. modele: całkowitego, standardowego i pośredniego blokowania oraz model filtracji plackowej [22], [23], [24]. Zwykle w celu analizy wyników eksperymentów zakłada się tylko jeden z tych mechanizmów blokujących, lecz należy rozumieć, że sam proces spadku strumienia permeatu jest bardziej złożony i może zachodzić w nim kolejno kilka bądź wszystkie modele blokowania membrany [25]. W związku ze złożonością procesu blokowania membrany może się zdarzyć, że kilka mechanizmów bądź żaden będą poprawnie wyjaśniać spadek strumienia permeatu z powodu foulingu. W takiej sytuacji można zastosować łączone modele, których zastosowanie pozwala określić dominujący mechanizm blokowania w danym momencie filtracji [25], [26].

Zaprezentowany model matematyczny [27], [28] przedstawia spadek permeatu w czasie podczas filtracji krzyżowej:

$$-\frac{dJ}{dt} = K_n \cdot (J - J^*) \cdot J^{2-n} \quad (1.1)$$

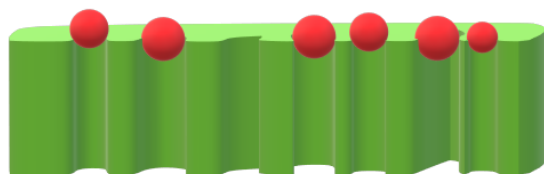
gdzie:

- $J$  – Natężenie strumienia permeatu ( $\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )
- $t$  – czas (s)
- $J^*$  - krytyczny strumień permeatu założony jako ustalony strumień permeatu gdy  $t \rightarrow \infty$
- $K_n$  oraz  $n$  – parametry odpowiadające poszczególnym modelom blokowania membrany

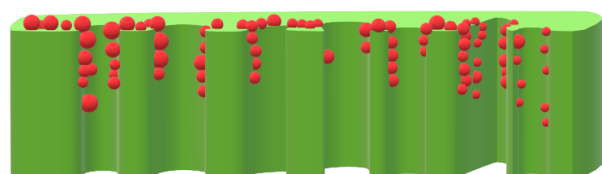
Tabela 1.1 przedstawia wartości parametru  $n$  ze wzoru (1.1) odpowiadającemu konkretnemu modelowi blokowania membrany. Na Rysunku 1.1 przedstawiono graficznie sposób blokowania porów membrany przez bakterie dla każdego przypadku rozważanego w wykorzystanym modelu. Model całkowitego blokowania ( $n=2$ ) zakłada, że każda cząstka osadzająca się na membranie blokuje por lub pory bez zachodzącego zjawiska osadzania kolejnych cząstek na już zdeponowanych na powierzchni membrany. Model standardowego blokowania ( $n=1.5$ ) zakłada, że cząstki osadzają się we wewnętrznych ścianach porów, co prowadzi do zmniejszenia ich objętości. Model pośredniego blokowania ( $n=1$ ) zakłada, że każda cząstka może osadzić się na istniejących już na powierzchni membrany, bądź blokować bezpośrednio część membrany. Model filtracji plackowej ( $n=0$ ) zakłada, że każda cząstka osadza się na innych cząstkach już zdeponowanych, które już blokują niektóre pory. W tym modelu nowe cząstki nie mają miejsca na bezpośrednie blokowanie jakiegось obszaru membrany. W wyniku takiego sposobu osadzania się cząstek na membranie powstaje tzw. placek filtracyjny [24].

Tabela 1. 1 Rodzaje blokowania membrany wraz z wartościami parametru  $n$ .

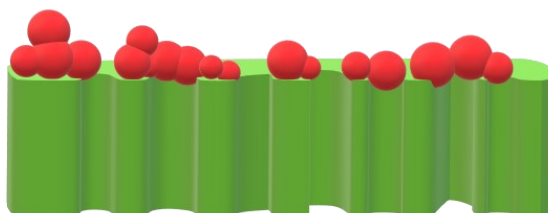
Model blokowania membrany	Wartość parametru $n$
Całkowite blokowanie	2
Standardowe blokowanie	1.5
Pośrednie blokowanie	1
Filtracja plackowa	0



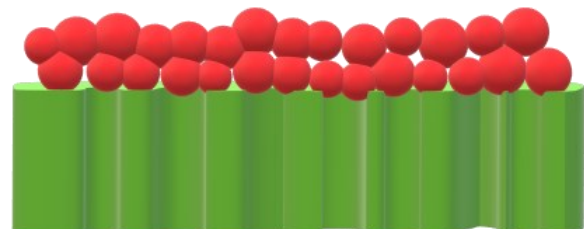
a)



b)



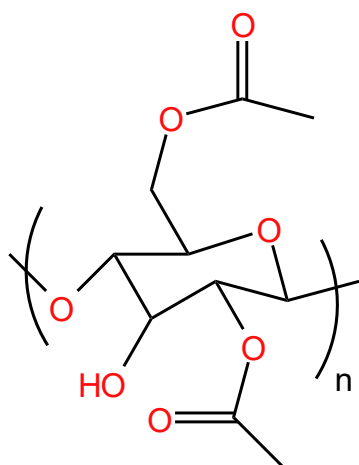
c)



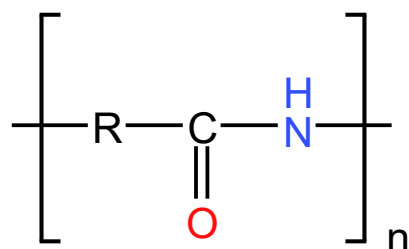
d)

Rysunek 1. 1 Ilustracja blokowania membrany dla a) Całkowitego blokowania, b) Standardowego blokowania, c) Pośredniego blokowania, d) Filtracji plackowej; Kolorem czerwonym przedstawiono bakterie zdeponowane na powierzchni membrany

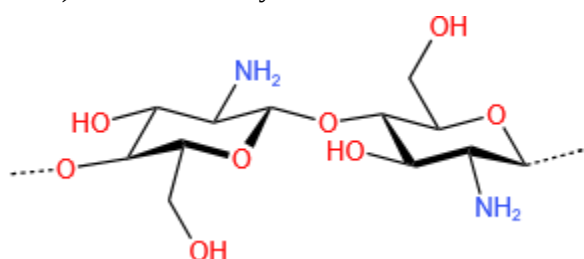
### 1.3 Zastosowanie octanu celulozy, poliamidu, skrobi i chitozanu



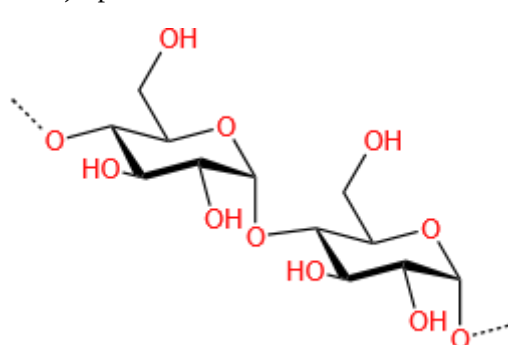
a) Octan celulozy



b) poliamid



c) chitozan



d) skrobia

Rysunek 1. 2 Wzory strukturalne: a) octanu celulozy; b) poliamidów; R oznacza resztę związku użytego do syntezy; c) chitozanu; d) skrobi

Octan celulozy (Rysunek 1.2a) to ester octanowy celulozy. Celuloza zaś jest polisacharydem składającym się z liniowego łańcucha liczącego od kilkuset do ponad dziesięciu tysięcy połączonych jednostek D-glukozy. Celuloza pozyskiwana jest głównie z miazgi drzewnej i bawełny, ta zaś pozyskana z bambusa jest powszechnie stosowana do wytwarzania tkanin. Celuloza jest modyfikowana chemicznie w celu wytworzenia wielu polimerów, które znajdują zastosowanie w produkcji tworzyw sztucznych lub powłok [29].

Octan celulozy został po raz pierwszy wyprodukowany w 1865 roku i był wykorzystywany do produkcji podkładów filmowych w fotografii i włóknach syntetycznych. Była to termoplastyczna żywica biodegradowalna poprzez estryfikację grup hydroksylowych w łańcuchu celulozy. Jego właściwości zależą od stopnia acetylacji. [30] Ponadto jest naturalnym, biodegradowalnym polimerem wykorzystywanym szeroko w wielu branżach w formie tekstyliów, tworzyw sztucznych, folii, membran w separacji cieczy i gazów oraz wielu innych. Octan celulozy jest uważany za substancję bezpieczną i ma status GRAS (ang. *Generally recognized as safe*), który wydaje amerykańska instytucja rządowa Agencja Żywności i Leków

(ang. *Food and Drug Administration*)[31]. Podobnie wiele zastosowań CA i jego form można znaleźć w przemyśle opakowań do żywności, gdzie jest stosowany jako sztywne folie do pakowania [32]. To czyni ten polimer obecnym w niemal wszystkich sferach współczesnego życia [33].

Membrany z octanu celulozy są szeroko wykorzystywane w procesie odwróconej osmozy celem odsalania wody. Stopień acetylacji wpływa na selektywność membrany. Wyższa wartość acetylacji oznacza niższy strumień permeatu przy wyższym stopniu usunięcia. Membrany te są globalnie stosowane do oczyszczania wód powierzchniowych przy pomocy modułów membranowych. Membrany z octanu celulozy są również stosowane w systemach hemodializy, sztucznych nerek. W skali laboratoryjnej membrany z octanu celulozy są stosowane przykładowo w mikrofiltracji mikroorganizmów [34].

Membrany bazujące na octanie celulozy są stosowane komercyjnie od połowy lat 80 XX wieku w procesach separacji ditlenku węgla od metanu. 80% rynku membran przetwórstwa gazu ziemnego stanowią kombinacje membran z octanu celulozy, dioctanu celulozy i trioctanu celulozy. Podobnie jak w separacji cieczy, dobór stopnia acetylacji pozwala na dostosowanie selektywności i przepuszczalności membrany [[35].

Folie wytworzone z octanu celulozy są zwykle używane do owijania wypieków i świeżo wyprodukowanej żywności. Jednakże w celu nadania plastyczności takim wyrobom wymagane jest dodanie plastyfikatorów. Uzyskany produkt cechuje się stabilnością wymiarową, odpowiednią sztywnością, odporność na przebicie, łatwością w drukowaniu oraz ma pożądaną połysk i przejrzystość. [30]

Niemniej cechy octanu celulozy jak wysoka biokompatybilność, nietoksyczność, doskonała integracja tkankowa i neutralność immunologiczna obok taniości i łatwej dostępności materiału [36] sprawiły, że polimer ten znalazł szereg zastosowań, przykładowo: w inżynierii kultur tkankowych i komórkowych, immobilizacji i nośników substancji bioaktywnych, materiałów wspomagających gojenie ran oraz projektowaniu biosensorów [37][38][39].

Poliamidami nazywamy zbiór polimerów, które zawierają powtarzające się grupy amidowe (R-CO-NH-R') stanowiące integralne części głównego łańcucha polimerowego (Rysunek 1.2b) [40]. Najbardziej znanymi polimerami z tej rodziny są PA-6 (zwany też Nylon-6 bądź Polikaprolaktam) oraz PA-66 (zwany też Nylon-66). Technologia wytwarzania poliamidów powstała przed II wojną światową i do dziś jest rozwijana. Wciąż powstają nowe polimery z grupy poliamidów, które mogą różnić się właściwościami takimi jak na przykładzie PA-610 względem PA-66 zmniejszenie absorpcji wilgoci i zwiększenie stabilności wymiarowej przy zmniejszeniu temperatury topnienia i rozciągliwości materiału. Ogólnie poliamidy mają dobre właściwości mechaniczne, są odporne na uszkodzenia ze względu na zużycie np. poprzez tarcie [41][42]. Poliamidy znalazły szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, tj. przemysł włókienniczy czy transportowy, elektryka i elektronika, jak i w wielu innych przedmiotach

codziennego użytku [42] Membrany zawierające poliamid są wykorzystywane w procesach filtracji gazów [[43] a także w filtracji wody [44].

Chitozan (Rysunek 1.2c) jest produktem procesu deacetylizacji chityny. Chityna zaś jest drugim, najbardziej powszechnie i naturalnie występującym polimerem w przyrodzie po celulozie. Biosynteza chityny osiąga miliard ton rocznie [45], [46], [47].

Chitozan jest nietoksyczny, biokompatybilny, biodegradowalny i nie wykazuje właściwości antygenowych. Posiada on naturalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, które otwiera możliwości różnych zastosowań w branży opakowań (Tan i in. 2015). Chitozan znalazł szerokie zastosowanie, które różni się w zależności od masy cząsteczkowej i stopnia deacetylacji. Zależności te zostały ukazane w Tabeli 1.2.

Tabela 1. 2 Aplikacja chitozanu w zależności od stopnia deacetylacji oraz masy cząsteczkowej chitozanu.[48]

	wysoka masa cząsteczkowa (>300 kDa)	niższa masa cząsteczkowa (<300 kDa)
Wysoki stopień deacetylacji (70-95%)	nośniki leków, suplementy diety, inżynieria tkankowa, pakowanie żywności, immobilizacja enzymów	oczyszczanie ścieków, konserwaty spożywcze, leczenie ran, druk molekularny
niski stopień deacetylacji (55-70%)	Przemysł spożywczy, przemysł farmaceutyczny, kompozyty	Nośniki leków, nośniki genów, rolnictwo

Właściwości tego polimeru mogą zostać znacznie poprawione poprzez modyfikację chemiczną lub łączenie go w blendach polimerowych bądź zastosowaniu innych dodatków do struktury polimerowej. Możliwa jest zmiana parametrów takich jak wytrzymałość mechaniczna, odporność na rozciąganie, wzmocnienie efektu przeciwdrobnoustrojowego. Materiał kompozytowy z chitozanem może być zaimpregnowany substancją aktywną, która byłaby uwalniana powoli ze struktury, co skutecznie chroniłoby pakowaną żywność chroniąc ją przed zepsuciem [49].

Skrobia (Rysunek 1.2d) to biopolimer wytwarzany między innymi z pszenicy, ziemniaków, kukurydzy, ryżu i manioku. Skrobia jest łatwo dostępna w dużych ilościach, przez co jest tania i ulega biodegradacji [50], [51]. Jest to ponadto organiczny związek chemiczny, który występuje powszechnie w roślinach i pełni wiele istotnych funkcji zarówno w naturze, jak i w przemyśle. Skrobia to polisacharyd składający się z długich łańcuchów glukozy, połączonych ze sobą wiązaniami glikozydowymi. Skrobia stanowi główne źródło energii dla organizmów roślinnych, odgrywając kluczową rolę w procesie fotosyntezy. Jednakże jej znaczenie sięga również poza świat roślinny [52], [53].

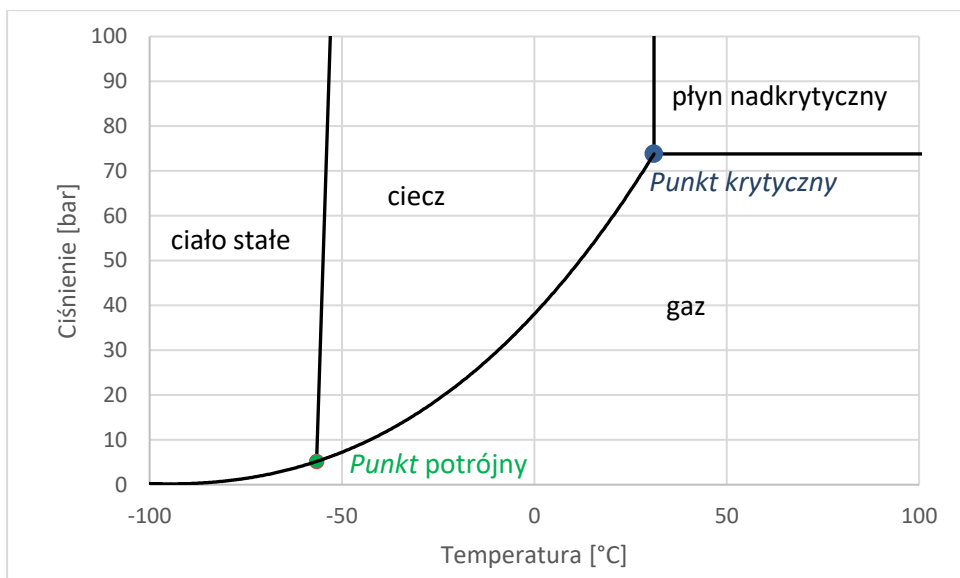


W przemyśle spożywczym skrobia jest powszechnie wykorzystywana jako zagęstnik, stabilizator oraz nośnik substancji aktywnych. Pełni rolę regulatora konsystencji w wielu produktach spożywczych, od zup i sosów po ciastka i lody. Jednak, ze względu na swoje naturalne ograniczenia, skrobia musi być modyfikowana chemicznie lub fizycznie, aby poprawić jej właściwości lub zminimalizować wady. Modyfikowana skrobia znajduje zastosowanie w formułach kosmetyków i może być także stosowana w produkcji biodegradowalnych tworzyw sztucznych, zastępując tradycyjne tworzywa na bazie ropy naftowej. Skrobia jest także ważnym składnikiem w produkcji papieru, gdzie działa jako spoiwo, zwiększając wytrzymałość, poprawia estetykę papieru i końcową jakość wydruków. W przemyśle farmaceutycznym skrobia jest stosowana jako wypełniacz i zagęstnik w produkcji leków w postaci tabletek i kapsułek. Dodatkowo skrobia może być wykorzystywana w przemyśle tekstylnym, do wykończenia tkanin, poprawiając ich wygląd i właściwości [51].

#### 1.4 Historia i rozwój technik wysokociśnieniowych

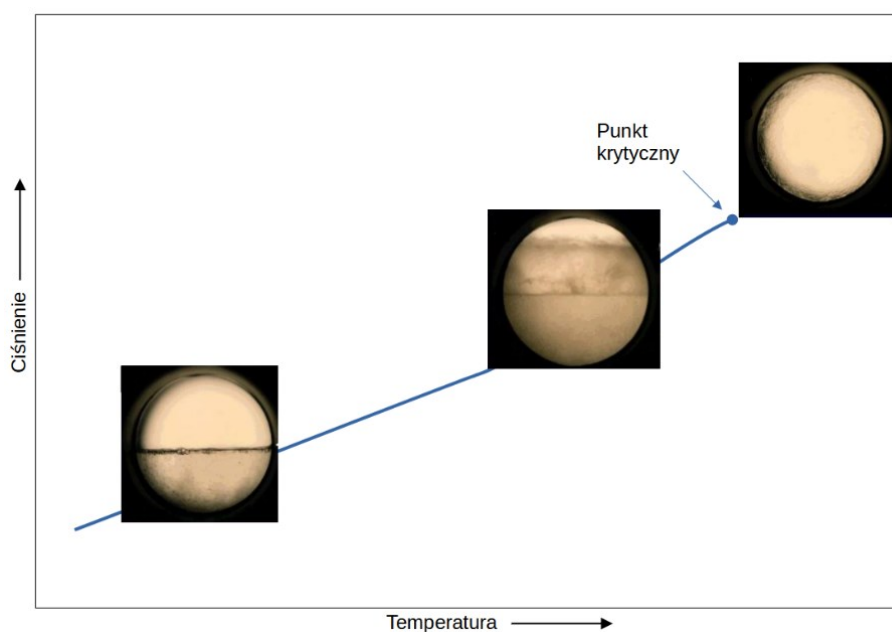
W roku 1822 Cagniard de la Tour dokonał odkrycia zjawiska, które dziś nazywamy punktem krytycznym. W swych eksperymentach akustycznych użył on wypełnioną cieczą komorę fermentacyjnej Papina. Umieścił w niej krzemową kulę, która przy obrocie aparatury generowała dźwięk za każdym razem, gdy przemieszczała się przez powierzchnię styku ciecz-para. Cagniard zaobserwował, że po podgrzaniu układu znacznie powyżej temperatury wrzenia, dźwięk wpadania kulki do cieczy ustaje. Cagniard de la Tour opisał również w dwóch artykułach w „Annales de Chimie et de Physique” zjawisko, w którym po podgrzaniu zamkniętej rurki z alkoholem pod ciśnieniem ciecz rozszerzyła się do około dwukrotności pierwotnej objętości. Następnie ciecz ta zamieniła się w gaz tak przezroczysty, że tuba eksperymentalna wydawała się całkowicie pusta. Po ochłodzeniu układu zaobserwowano gęstą chmurę. Dziś uznajemy to za zaobserwowanie krytycznej opalescencji i odkrycie punktu krytycznego [54].

Ostatecznie przytoczone tutaj określenie punktu krytycznego zostało zaproponowane przez Thomasa Andrewsa w 1869 roku, który wykazał, że gaz może się skraplać, a ciecz odparować jedynie poniżej danej wartości temperatury i ciśnienia. Powyżej tych wartości znajduje się faza nadkrytyczna, w której zanika rozróżnienie fazy ciekłej i gazowej [54][55].



Rysunek 1. 3 Wykres fazowy ditlenku węgla

Na Rysunku 1.3 przedstawiono wykres fazowy pojedynczej, czystej substancji na przykładzie ditlenku węgla. Widoczne są cztery fazy, które rozdzielone są liniami granicznymi, tj. liniami równowagowymi. Linie te reprezentują zbiory punktów współrzędnych ciśnienia i temperatury, w których odpowiednie fazy współistnieją w równowadze. Punkt potrójny reprezentuje warunki, w których współistnieją trzy fazy: fazy ciekła, stała i gazowa. Podążając za krzywą prężności pary od punktu potrójnego do punktu krytycznego, poruszamy się zestawem punktów reprezentujących wartości ciśnień i temperatury, w których fazy ciekła i gazowa znajdują się w równowadze [56].



Rysunek 1. 4 Zanik menisku między fazą ciekłą i gazową ditlenku węgla przy wzroście ciśnienia i temperatury w pobliżu punktu krytycznego; [na podstawie [57][58]]

Osiągnąwszy punkt krytyczny, obie te fazy łączą się, ponieważ zanika menisk pomiędzy fazami (Rysunek 1.4). Faza ta nazywana jest płynem nadkrytycznym, natomiast ciśnienie i temperatura w tym punkcie nazywane są kolejno ciśnieniem krytycznym i temperaturą krytyczną. Zmiana właściwości fazy nie następuje natychmiastowo, lecz stopniowo wraz z przekroczeniem punktu krytycznego. Gęstość płynu nadkrytycznego jest bliższa cieczy, lepkość zaś jest bliższa stanowi gazowemu [56][59]. Istotną właściwością płynu nadkrytycznego jest brak napięcia powierzchniowego [60].

W obszarze na Rysunku 1.4 na lewo od regionu nadkrytycznego występuje obszar płynu podkrytycznego (lub subkrytycznego, ang. *subcritical*). Płyn podkrytyczny definiowany jest jako płyn o temperaturze pomiędzy temperaturą wrzenia a temperaturą krytyczną oraz o ciśnieniu pozwalającym na utrzymanie stanu ciekłego. W związku z tym wymagane ciśnienie dla stanu podkrytycznego jest wyższe od równowagowej prężności w danej temperaturze. Płyny podkrytyczne mają właściwości zbliżone do płynu nadkrytycznego i znajdują zastosowania w procesach takich jak ekstrakcja [61], [62].

Na skalę przemysłową płyny nadkrytyczne są stosowane komercyjnie m.in. w procesach branży farmaceutycznej, spożywczej i tekstylnej. Wykorzystywane są również w produkcji aerozeli, chromatografii wysokociśnieniowej, w produkcji nowych materiałów przy pomocy reakcji w fazie nadkrytycznej lub poprzez jego impregnację (saturację). Płyny nadkrytyczne są stosowane również w procesach ekstrakcji materiałów stałych bądź ciekłych, w praniu „na sucho”, w sterylizacji wysokociśnieniowej, w dyszach tnących, jako rozpuszczalniki w syntezach chemicznych. Płyny nadkrytyczne odznaczają się wyższą przewodnością cieplną, więc były rozważane jako alternatywne czynniki, ciecze robocze w systemach przenoszenia ciepła takich jak klimatyzacje w samochodach. Od lat 90 XX wieku rozważano zastosowanie ich jako czynnika chłodzącego w reaktorach jądrowych celem poprawy wydajności reaktorów chłodzonych wodą. Obecnie wykorzystanie wody w stanie nadkrytycznym w konwencjonalnych elektrowniach cieplnych jest największym przemysłowym zastosowaniem płynów pod ciśnieniem nadkrytycznym [63], [64]. Nadkrytyczna woda stosowana jest również w procesie zgazowania odpadów organicznych, w tym biomasy, celem uzyskania gazów syntetycznych (metan, wodór, tlenek i ditlenek węgla) [65], [66]. Rośnie ponadto zainteresowanie użycia ich w procesach przetwarzania odpadów i biomasy w celu odzyskania pożądanych składników, m.in. biooleje, wodór, metan [67] [58], [59], [68].

Powszechnie stosowanym rozpuszczalnikiem krytycznym w przemyśle jest ditlenek węgla. Powodem jego popularności są właściwości tj.: nietoksyczność, niepalność, niekorozyjność, łatwa dostępność, tania. Ciśnienie krytyczne oraz temperatura krytyczna wynoszą odpowiednio 7.38 MPa, oraz 304.13 K. Należy zwrócić uwagę, że temperatura ta jest niska, co ma znaczenie przy obróbce substancji czułych na temperaturę. Ditlenek węgla ma możliwość rozpuszczania szerokiego spektrum substancji: od niepolarnych do umiarkowanie polarnych. Spektrum to może zostać poszerzone poprzez dodanie odpowiedniego współrozpuszczalnika [69][70][71].

Dla porównania w Tabeli 1.3 przedstawiono wybrane parametry krytyczne innych, popularnych rozpuszczalników stosowanych w procesach wysokociśnieniowych [59].

Tabela 1. 3 Temperatura i ciśnienie krytyczne wybranych rozpuszczalników

Rozpuszczalnik	Temperatura krytyczna [K]	Ciśnienie krytyczne [MPa]
Woda	647.3	22.12
Metan	190.4	4.60
Etan	305.3	4.87
Propan	369.8	4.25
Etylen	282.4	5.04
Propylen	364.9	4.60
Metanol	512.6	8.09
Etanol	513.9	6.14
Aceton	508.1	4.70

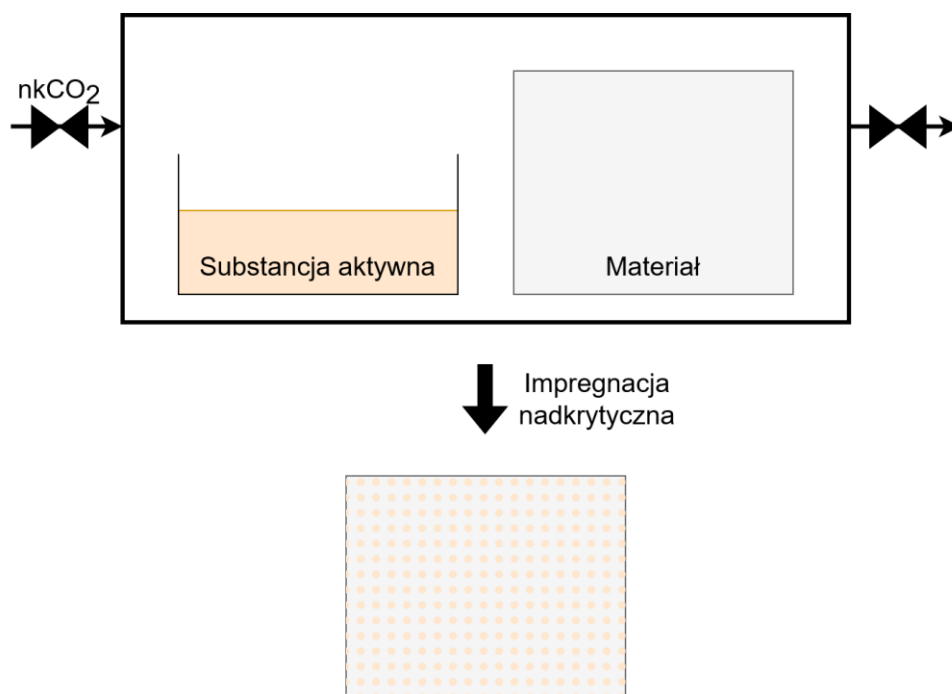
Płyny nadkrytyczne występują naturalnie na Ziemi, konkretnie nadkrytyczna woda w pobliżu podwodnych wulkanów, tj. obszaru wysokiej temperatury i wysokiego ciśnienia [72].

## 1.5 Impregnacja materiałów polimerowych metodą konwencjonalną i nadkrytyczną

Impregnacja to proces, w którym dany materiał jest nasycany inną substancją [73]. Powszechnie stosowaną metodą jest impregnacja w fazie ciekłej, czyli metoda zanurzeniowa, która wymaga zanurzenia materiału w cieczy (np. w wodzie z rozpuszczoną substancją aktywną). Metoda ta ma ograniczoną skuteczność wynikającą z zastosowanego medium, w którym przeprowadzana jest impregnacja. W tym celu podejmowano i badano szereg usprawnień mających podnieść wydajność procesu modyfikacji. W stosunku do procesu impregnacji drewna zaproponowano modyfikację wstępną poprzez ściskanie, sprasowanie drewna, co poprawia późniejszą penetrację struktury drewna przez ciecz. Innymi metodami jest obróbka falami mikrofalowymi, obróbka chemiczna lub biologiczna. Raportowane jest też wykorzystanie ultradźwięków w celu usprawnienia penetracji struktury drewna przez ciecz. Mimo wszystko proces impregnacji drewna metodą konwencjonalną uniemożliwia ciasne upakowanie kłód drewna podczas procesu oraz generuje znaczne ilości zanieczyszczonych ścieków i stałych odpadów [68], [74].

Wspomniane ograniczenia i konieczność ich minimalizowania jest związana z napięciem powierzchniowym cieczy, w której przeprowadzany jest proces impregnacji. Ponadto stosowanie impregnacji w fazie ciekłej wiąże się z niższą dyfuzyjnością, a przez to dłuższą impregnacją, która nie zajdzie równomiernie w całej objętości modyfikowanej matrycy materiału. Jedną z odmian metody impregnacji o udowodnionej skuteczności modyfikacji materiałów to impregnacja nadkrytyczna (SSI). Wymaga ona substancji aktywnej rozpuszczalnej w fazie nadkrytycznej, przykładowo w nadkrytycznym

ditlenku węgla. W typowym procesie umieszcza się materiał przeznaczony do impregnacji w naczyniu wysokociśnieniowym obok umieszczonej substancji aktywnej, co przedstawiono na Rysunku 1.5. Po wtłoczeniu i sprężeniu ditlenku węgla w układzie do wartości wysokociśnieniowych nadkrytyczna faza, w której rozpuszczona jest substancja aktywna penetruje materiał stały [75]. Niska lepkość i brak napięcia powierzchniowego umożliwiają penetrację substancją aktywną materiału w jego całej objętości [60]. Po zakończeniu procesu impregnacji układ poddaje się dekompresji. Substancja aktywna zaś pozostaje w strukturze materiału w wyniku obniżenia rozpuszczalności spowodowaną obniżeniem ciśnienia w trakcie dekompresji. Rozpuszczalnik ditlenek węgla po procesie nie pozostawia śladów w otrzymanym materiale, gdyż usuwany jest naturalnie poprzez zjawisko dyfuzji. W porównaniu do metody konwencjonalnej metoda impregnacji w fazie nadkrytycznej umożliwia eliminację wody (lub rozpuszczalnika organicznego) z procesu i produkcji zanieczyszczonych substancją aktywną ścieków [68], [76].

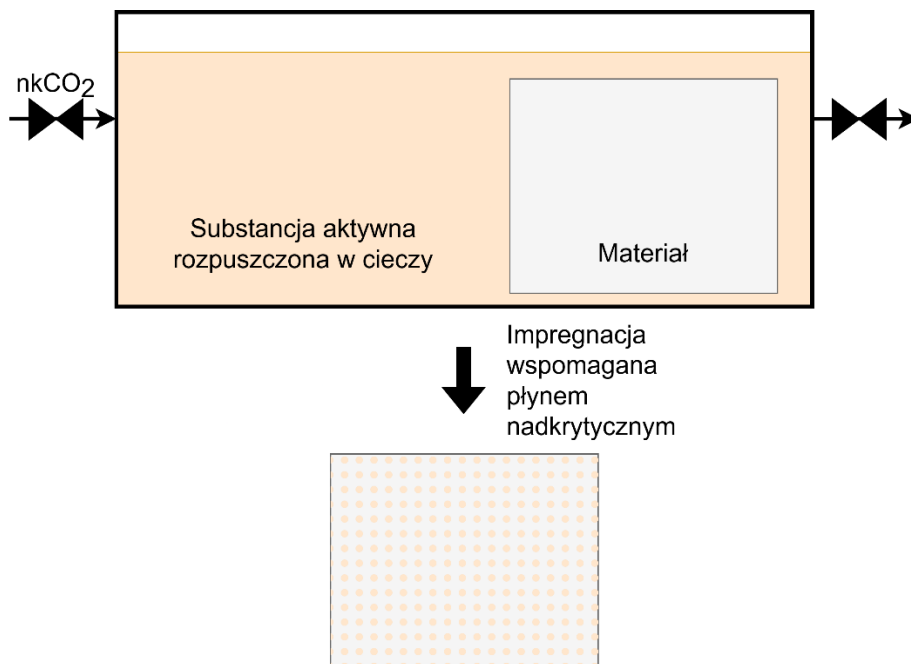


Rysunek 1. 5 Schemat procesu impregnacji nadkrytycznej (SSI)

Jedne z substancji, które są rozpuszczalne w nadkrytycznym ditlenku węgla to karwakrol [77] oraz jego izomer tymol [78]. Substancje te wykazują silne działania antybakteryjne i zostały wykorzystane w wielu badaniach naukowych jako substancje aktywne. Doniesiono, że substancje te mają znaczące działanie przeciwbakteryjne zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Karwakrol i tymol są ogólnie uznawane za bezpieczne (status GRAS) oraz dopuszczono je jako dodatek do żywności [79], [80]. Zastosowanie materiałów zmodyfikowanych metodą impregnacji nadkrytycznej przy pomocy karwakrolu jako substancji aktywnej w zwalczaniu bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* zostało wykazane jako skuteczne pod warunkiem odpowiednio wysokiego załadunku w strukturze zaimpregnowanego materiału. Milovanovic i in. wykazali, że 14,4% załadunek karwakrolu w strukturze bawełnianej gazy gwarantuje właściwości antybakteryjne przeciw szeregowi mikroorganizmów – w tym bakteriom *E.coli*

i *S. aureus* [77]. Wykazano, że maksymalny załadunek karwakrolu osiągnięty metodą impregnacji nadkrytycznej w strukturze octanu celulozy wynosi około 60% zaś dla tymolu 72%. Octan celulozy zaimpregnowany wysoką dawką karwakrolu wykazał znaczące właściwości antybakteryjne – w tym przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i ujemnym w tym przeciw *S. aureus* opornego na metycylinę (MRSA). Również próbka zmodyfikowana tymolem wykazała działanie przeciwbakteryjne wobec 23 badanych szczepów bakterii, w tym *S. aureus* opornego na metycylinę (MRSA) [78] [81]. Bardzo wysoki załadunek tymolem poskutkował jednak znacznym osłabieniem wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami polimerowymi i w dalszej kolejności jego pęcznieniem i zmianą kształtu, natomiast badanie SEM wykazało zaniknięcie struktury porowatej. Wykazano również, że maksymalny stopień impregnacji nie jest zależny od ciśnienia. Ciśnienie zaś zwiększa szybkość impregnacji [81]. Zizovic i in. [82] wykazali, że membrana wytworzona metodą solvent-casting zaimpregnowana w 30% tymolem wykazuje właściwości antybiofilmowe i antybakteryjne przeciw *P. aeruginosa* i *S. aureus* [82]. Wiele innych substancji, naturalnych ekstraktów zostało użytych w celu uzyskania zaimpregnowanych materiałów o właściwościach antybakteryjnych metodą impregnacji nadkrytycznej. Polilaktyd zaimpregnowany aldehydem cynamonowym wykazał właściwości antybakteryjne przeciw *E. coli* i *S. aureus* [83]. Również zaimpregnowany oligomerami na bazie 2-oksazoliny metodą SSI chitozan wykazał właściwości antybakteryjne przeciw *E. coli* i *S. aureus* [84].

W przypadku braku lub ograniczonej rozpuszczalności substancji aktywnej w nadkrytycznej fazie możliwe jest wykorzystanie metody impregnacji wspomaganej płynem nadkrytycznym (*ang. Supercritical Assisted Impregnation*, w skrócie SAI). Schemat procesu został przedstawiony na Rysunku 1.6. W metodzie tej dobiera się rozpuszczalnik ciekły, w którym substancja aktywna jest rozpuszczalna. Następnie w naczyniu wysokociśnieniowym zanurza się materiał przeznaczony do impregnacji w cieczy z substancją aktywną. Po wtłoczeniu ditlenku węgla i sprężeniu układu do wartości wysokociśnieniowych nadkrytyczny ditlenek węgla działa jako promotor kontaktu między cieczą a materiałem stałym. Podsumowując, w impregnacji nadkrytycznej, SSI następuje kontakt dwóch faz: materiału impregnowanego oraz fazy nadkrytycznej z substancją aktywną. W SAI występuje kontakt trzech faz: materiału impregnowanego, fazy nadkrytycznej oraz cieczy z substancją aktywną [75].



Rysunek 1. 6 Schemat procesu impregnacji wspomaganej płynem nadkrytycznym (SAI)

### 1.5.1 Raport literaturowy nt. materiałów uzyskanych z SSI

Metoda impregnacji nadkrytycznej znalazła zastosowanie w produkcji żywności funkcjonalnej. Jest to żywność zmodyfikowana bądź wzbogacona o dodatkowe składniki odżywcze. Metoda wysokociśnieniowa jest zieloną alternatywą wobec metod konwencjonalnych. Celem tej techniki jest enkapsulacja związku aktywnego w strukturze materiału celem ochrony przed degradacją, zwiększenia biodostępności i utrzymania bioaktywności [85]. Gonzalez raportuje, że odpowiednim materiałem-matrycą do bycia nośnikiem substancji aktywnej są aerożele oparte na polisacharydach. Wskutek ich otwartej struktury porowatej i wysokiej powierzchni właściwej notuje się wzrost zainteresowania nimi w sektorze farmaceutycznym i biomedycznym. Ponadto są w stanie zapewnić zwiększoną biodostępność leku i zapewniają możliwość wysokiego załadunku substancji aktywnej [86]. Milanovic i in. w swej publikacji zaprezentowali wyniki impregnacji nadkrytycznej aerożeli i kserożeli opartych na skrobi. Substancją aktywną zaimpregnowaną do struktury był tymol. W tym celu impregnowano próbki w 35°C u 15,5 MPa przez 24 godziny przy użyciu nadkrytycznego ditlenku węgla. Uzyskany załadunek tymolu zależał od rodzaju aerożelu lub hydrożelu. W zależności od pochodzenia skrobi uzyskano załadunek w przedziale (0,58–3,31%). Kserożele charakteryzowały się nieco wyższym załadunkiem tymolu (1,76–4,02%) przy tych samych warunkach procesowych [87]. Araujo i in. zaprezentowali impregnację aerożeli ze skrobi kukurydzianej polifenolami z wyłoków z marakui. W swej pracy autorzy zaprezentowali szeroki zakres parametrów procesowych, tj. 22,5-37,5MPa i 45-65°C. Badania te są przydatne w opracowaniu nowych metod dostarczania polifenoli do nutraceutyków i produktów spożywczych [88].

Wykorzystanie nadkrytycznego ditlenku węgla jako rozpuszczalnika w procesie impregnacji jest stosowane na skalę przemysłową w procesach barwienia. Konwencjonalne metody w procesie barwienia

włókien Poli(tereftalan etylenu) (PET) wymagają tworzenia dużej ilości ścieków, które ponadto są zanieczyszczone środkami powierzchniowo-czynnymi, środkami dyspergującymi lub nieużyтым barwnikiem. Zastosowanie metody wysokociśnieniowej pozwala na eliminację użycia wody, środków dyspersyjnych czy powierzchniowoczynnych. Według pracy Kikic i in. technika impregnacji nadkrytycznej nie rozprzestrzeniła się tak szeroko z powodu wysokich kosztów inwestycyjnych. Sugerował on, by metoda ta była stosowana wobec materiałów trudnych do barwienia, przykładowo włókien lub filmów z PE, bądź PP [76].

Możliwe jest również nadanie włóknom barwy przy jednoczesnym nadaniu materiałowi właściwości antybakteryjnych. Elmaaty i in. Wykorzystali metodę impregnacji nadkrytycznej do zmodyfikowania tkaniny poliesterowej załadowując barwniki hydrazonopropanonitrylowe. Autorzy podają, że optymalna temperatura i ciśnienie barwienia wynoszą odpowiednio 120°C i 15 MPa. Otrzymany materiał wykazywał odporność na wymywanie wodą, tarcie i ekspozycję na światło, a także doskonałe właściwości antybakteryjne przeciw bakteriom Gram+ i Gram-[89]. W celu produkcji aktywnego opakowania żywności wykonano impregnację sub- i nadkrytyczną tymolem liniowego polietylenu małej gęstości (LLDPE, *ang. linear low density polyethylene*). W badaniach tych impregnowano polimer w temperaturze 313 K i ciśnieniu 7-12 MPa [90]. Pajnik i in. wykorzystali metodę impregnacji nadkrytycznej załadowania materiałów biokompozytowych tymolem jako substancją aktywną w celu uzyskania potencjalnego aktywnego materiału opakowaniowego. Zmodyfikowano filmy ze skrobi i chitozanu, a także filmy ze skrobi-chitozanu-zeolitu. Doświadczenie przy użyciu nadkrytycznego ditlenku węgla prowadzono w 35°C i ciśnieniu 15.5 i 30 MPa, badając czas 4-24 godziny. Załadunek substancji aktywnej do materiałów ze skrobi i chitozanu oraz skrobi-chitozanu-zeolitu wynosił kolejno maksymalnie 10,8% oraz 27,3%. Materiał o załadunku tymolu około 24% wykazywał silne właściwości antybakteryjne przeciwko bakteriom *E. coli* oraz opornym na metycylinę *Staphylococcus (S.) aureus* (MRSA) [91].

Drewno jest surowcem poddawany impregnacji celem zabezpieczenia go przed biodegradacją i wydłużeniem jego żywotności. W przeciwieństwie do klasycznych metod impregnacji impregnacja metodą nadkrytyczną eliminuje produkcję ścieków (wodnych lub organicznych) zanieczyszczonych substancją aktywną. Ponadto drewno zaimpregnowane metodą nadkrytyczną substancją grzybobójczą jest równomiernie zaimpregnowane w całej objętości, zachowuje swoją strukturę i nie wymaga usuwania rozpuszczalnika po procesie. Co więcej, proces ten pozwala na dostosowanie dawki substancji aktywnej, modyfikację drewna twardego bądź miękkiego, natomiast zaimpregnowany materiał po skończonej żywotności może być składowany na zwykłym wysypisku śmieci. Wykorzystanie technologii wysokociśnieniowej jest również znacznie bardziej wydajne energetycznie względem metody konwencjonalnej. Pierwszą komercyjną instalacją na świecie przeznaczoną do impregnacji drewna metodą nadkrytyczną jest instalacja w Hampen w Danii. Otwarcie jej nastąpiło w marcu 2002 roku. Zdolności produkcyjne roczne wynoszą 40-60 tysięcy m<sup>3</sup> zmodyfikowanego materiału. Zakład ten oferuje wysoki odzysk CO<sub>2</sub> (>96%), niską konsumpcję energetyczną, wysoką elastyczność [92], [93], [94], [95].



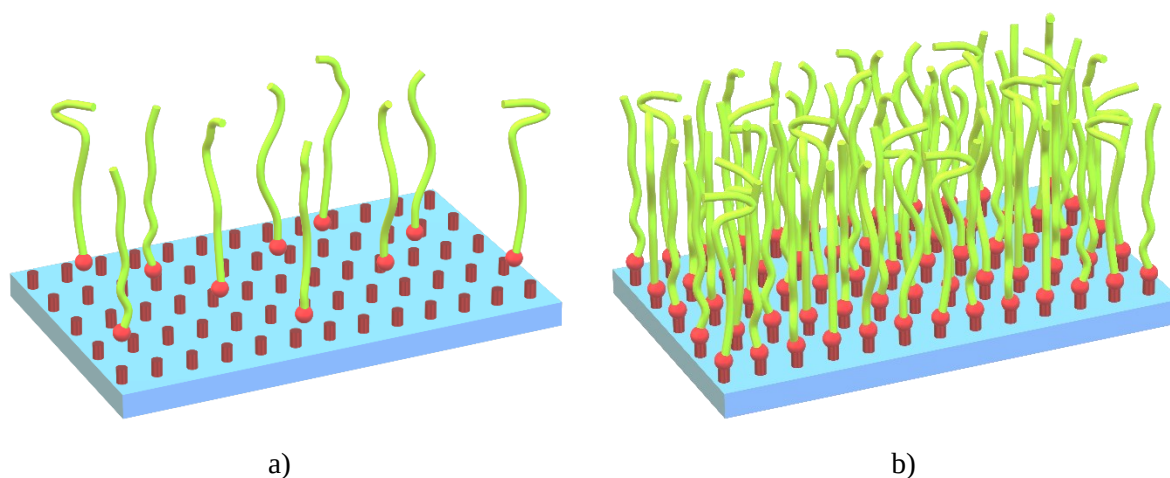
Impregnacji poddano również drewno z gatunku *Eucalyptus nitens*. Gatunek ten jest głównie sadzony pod produkcję celulozy i papieru. Twardziel (wewnętrzna część pnia odpowiedzialna za mechaniczne podtrzymanie drzewa) gatunku *E. nitens* charakteryzuje się niską trwałością i odpornością na penetrację środków konserwujących w procesie konwencjonalnej impregnacji. Wood i in. zastosowali metodę impregnacji nadkrytycznej przy użyciu ditlenku węgla w celu załadowania biocydów do w głąb struktury drewnianych desek. Impregnację prowadzono przez 7 godzin w 45°C i maksymalnie 15 MPa. Po modyfikacji zbadano próbki z różnych stref zmodyfikowanych desek i stwierdzono obecność biocydów w całej objętości struktury materiału [94].

## 1.6 Szczepienie chemiczne jako metoda modyfikacji polimerów

Szczepienie (ang. grafting) polimerów jest metodą polegającą na chemicznym przyłączeniu substancji chemicznej a powierzchnią stałą polimeru.[96] Szczepienie można przeprowadzić metodą „szczepienia na” lub „szczepienia z”. Pierwsza metoda polega reakcji funkcjonalizowanych końców cząsteczek polimerów z odpowiednimi grupami funkcyjnymi na powierzchni polimeru. W ten sposób tworzą się połączone łańcuchy polimeru. Metoda „szczepienia z” polega na inicjacji polimeryzacji z powierzchni polimeru skutkującej przyłączeniem grup inicjujących zwykle poprzez wiązania kowalencyjne [97].

Metody te są stosowane w celu uzyskania polimeru biobójczego. W takim przypadku stosuje się chemiczne przyłączenie substancji aktywnej o właściwościach biobójczych do struktury polimeru [98].

Rysunek 1.7 przedstawia graficznie materiał przed szczepieniem (a) i po pełnym procesie szczepienia (b). Na powierzchni materiału widoczne są bordowe wypustki symbolizujące grupy funkcyjne modyfikowanego materiału. Przed szczepieniem widoczne są nad powierzchnią monomery (kolor zielony) z grupą funkcyjną (kolor czerwony). Po procesie szczepienia, polimeryzacji otrzymywany jest nowy materiał o sfunkcjonalizowanej powierzchni (Rysunek 1.7b).



Rysunek 1. 7 Przyłączanie grup funkcyjnych substancji aktywnej (czerwone końcówki) do grup funkcyjnych modyfikowanego materiału (bordowe wypustki); przed reakcją (a) i po reakcji (b)

Podobnie jak w przypadku metody impregnacji, zastosowanie płynu nadkrytycznego w produkcji szczepionych polimerów pozwala na redukcję bądź eliminację niebezpiecznych odpadów organicznych oraz ścieków zanieczyszczonych rozpuszczoną substancją aktywną [67], [68], [76]. W procesach przetwarzania polimerów ditlenek węgla jest najczęściej stosowanym płynem nadkrytycznym ze względu na niską temperaturę krytyczną oraz wysoką rozpuszczalność w polimerach [99]. W tego typu procesach nadkrytyczny ditlenek węgla pełni funkcję medium transportowego i reakcyjnego [100]. Stojanovic i in. wykorzystali nadkrytyczny ditlenek węgla celem zbadania i porównania metod powlekania nanokrzemionki  $\gamma$ -metakryloksypropylotrimetoksylsilanem. W eksperymentach użyto etanolu jako współrozpuszczalnik w procesie szczepienia. Użycie metody wysokociśnieniowej z dodatkiem etanolu pozwoliło na uzyskanie minimalnej aglomeracji powlekanych nanocząstek i lepsze pokrycie krzemionki substancją aktywną. Nanokrzemionka jest jednym z najpopularniejszych nanonapełniaczy wykorzystywanym w produkcji nanokompozytów [60]. W pracy Tyrki i in. aminosilany zostały zaszczerpione do membran z octanu celulozy, dzięki czemu uzyskano materiał bardziej hydrofilowy względem membran niezmodyfikowanych. Ponadto wykazywały one właściwości antybiofilmowe względem szczepów *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i *Salmonella Enteritidis*. W innej pracy Correa i in. opracowali proces kwaternizacji oligo(2-metylo-2-oksazoliny) z N,N-dimetylododecyloaminą, w którym uzyskany produkt został zaszczerpiony do struktury chitozanu. Uzyskany materiał zabijał poniżej trzech minut ponad 99.999% bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* po bezpośrednim kontakcie. Na powierzchni zmodyfikowanego materiału nie obserwowano powstawania biofilmu [84]. Czwartorzędowe związki amoniowe zostały zaszczerpione do struktury drewna świerkowego z wykorzystaniem nadkrytycznego ditlenku węgla. Xu i in. zaprezentowali dwustopniową reakcję, w której w pierwszym stopniu przyłączono linker diizocyjanian heksametylenu do grup hydroksylowych obecnych w strukturze drewna. W drugim stopniu do otrzymanego materiału zaszczerpiono czwartorzędowe związki amoniowe z wykorzystaniem wiązania karbaminian/uretan. Otrzymane, zmodyfikowane drewno wykazywało właściwości antibakteryjne oraz poprawioną stabilność wymiarową. Wytworzony materiał może aplikowany w konstrukcjach typu tarasy czy ogrodzenia [101].

Czwartorzędowe związki amoniowe to związki jonowe zawierające w cząsteczce cztery grupy organiczne połączone poprzez 3 wiązania kowalencyjne i 1 koordynacyjne do atomu azotu [102]. Znane są one ze swych właściwości antibakteryjnych [103], natomiast potencjalne właściwości antybiofilmowe wymagają jeszcze dalszych badań. Związki te są szeroko stosowane w przemyśle chemicznym jako środki odkażające. W przeglądzie literaturowym Saveriny i in. przedstawiono kompleksowo badania nad czwartorzędownymi związkami amoniowymi pod kątem ich działania antibakteryjnego i antybiofilmowego. Omówione zostały przypadki, gdy związek ten był wykorzystywany samodzielnie, został osadzony na kompozytach i powłokach, bądź został zaszczerpiony do struktury polimerowej [104]. Według najlepszej wiedzy autora, wyniki szczepienia czwartorzędownego związku amoniowego do struktury octanu celulozy po raz pierwszy opublikowano w materiałach konferencyjnych konferencji ISSF 2022 [105]. Przedstawione

wyniki tej pracy, autorstwa zespołu, którego autor tej publikacji jest częścią, zostały przedstawione w pracy doktorskiej.

### 1.6.1 Szczepienie celulozy, skrobi i chitozanu

W chemii polimerów wprowadzono ostatnio nowe ścieżki wykorzystania celulozy do produkcji jej pochodnych, kompozytów i kopolimerów. Produkty te – oparte na biodegradowalnej celulozie – mogą zostać wykorzystane dzięki nabytej poprzez modyfikację nowej funkcjonalności. Modyfikacja chemiczna celulozy może poprawić właściwości chemiczne, fizyczne, mechaniczne bądź termiczne. Modyfikacji może ulec również zwilżalność materiału. Wszystkie te właściwości mogą zostać zmodyfikowane w zależności od rodzaju obranych substancji modyfikujących [106].

Obecne w strukturze celulozy grupy hydroksylowe mogą zostać przereagowane metodą szczepienia, skutkiem czego przyłączone zostają do celulozy jednostki monomeru lub polimery. W konsekwencji możliwe jest uzyskanie zaszczepionego polimeru o zaawansowanych właściwościach w porównaniu do polimeru pierwotnego, tj. niezmodyfikowanego [106], [107]. Jednak jak raportują Hansson i in., modyfikacja celulozy poprzez funkcjonalizację jej grup hydroksylowych może mieć wpływ na właściwości mechaniczne uzyskanego polimeru. Wynika to z istnienia wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi w strukturze polimeru. Jak raportują autorzy, wiązania te nie powinny zostać naruszone, jeśli nie przeprowadzi się wstępnej obróbki zasadą, która rozrywa owe połączenia [108].

Skrobia i chitozan również zawierają w swej strukturze grupy hydroksylowe. Aly i El-Bisi opisują metody szczepienia skrobi, wymieniając: metody fizyczne (inicjacja napromieniowaniem gamma, mikrofalami, wiązką elektronów, czy techniką mechanochemiczną), szczepienie winylem przy inicjacji cerem, inicjacja nadsiarczaniem, inicjacja reakcją redoks, inicjacja manganem, inicjacja układem redoks bromian/cykloheksanon, inicjacja układem redoks ditelluratokupratu potasu (III). Wszystkie przytoczone metody szczepienia wykorzystują grupy hydroksylowe obecne w strukturze skrobi [109], [110].

Autorzy wymienili również metody szczepienia chitozanu: metody fizyczne (inicjacja promieniowaniem gamma, UV, wiązką elektronów), metody enzymatyczne, metody chemiczne, inicjacja jonami cerowymi, reakcja redoks odczynnikami Fentona, inicjacja nadsiarczaniem. Techniki te prezentują szczepienie z wykorzystaniem grup aminowych i grup hydroksylowych chitozanu [109], [110], [111].

### 1.6.2 Aplikacja materiałów uzyskanych ze szczepienia chemicznego

Celuloza i skrobia są polisacharydami wykorzystywanymi jako reagujące na bodźce nośniki leków, tj. antybiotyki, steroidy, hormony, enzymy środki przeciwzapalne, przeciwgorączkowe czy przeciwbólowe, immunosupresanty czy leki antykoncepcyjne. Przykładowymi innymi polisacharydami wykorzystywanymi do kontrolowanego uwalniania leku to: chitozan, alginian, agar-agar, karagen, Siarczan chondroityny, guma gellanowa, heparyna, kwas hialuronowy, pektyna, skleroglukan, guma ksantonowa [106], [112].

Możliwe jest zmodyfikowanie materiału pierwotnego w taki sposób, by regulować uwalnianie substancji aktywnej w pożądanym sposobie. Przykładowo hydrożele na bazie skrobi zaszczipione monomerami akrylowymi mogą zostać wytworzone tak, by pęczniały w kontrolowany sposób. Zwiększona obecność monomerów obniżała zjawisko pęcznienia, co wydłużało czas uwalniania substancji aktywnej z wnętrza materiału [113], [114].

Chang i in. zaproponowali wykorzystanie hydrożeli na bazie celulozy jako superabsorbera. Obecne w strukturze grupy hydroksylowe zostały przereagowane przez karboksymetylocelulozę sodową w wodnym roztworze NaOH i mocznika poprzez sieciowanie za pomocą epichlorohydryny. Zauważono, że obecność celulozy w hydrożelu była niezbędna dla jego stabilności, a łańcuchy celulozy działały jako silny szkielet, utrzymujący stabilność hydrożelu. Hydrofilowy charakter karboksymetylocelulozy sodowej przyczynił się jednak do znacznego pęcznienia otrzymanego hydrożelu [115].

Materiały wykorzystujące szczepioną celulozę znalazły zastosowanie w opracowaniu elastycznych baterii. Jabbour i in. zastosowali celulozę mikrofibrylowaną jako element wiążący do produkcji samostojących i elastycznych elektrod przy użyciu prostego procesu odparowania wody [116]. Materiały bazujące na szczepionej celulozie są wykorzystywane również jako spoiwa do elektrod anodowych o dużej pojemności, tj. anody krzemowe o niskim potencjale wyładowania przy ekstremalnie wysokiej pojemności ładunkowej w porównaniu do anod grafitowych. Spoiwem tym był materiał nazwany NaPAA-g-CMC, który zsyntetyzowano metodą wolnorodnikowej polimeryzacji szczepionej, stosując karboksymetylocelulozę i kwas akrylowy jako prekursor oraz nadsiarczan jako inicjator rodnikowy [117].

Celulozę wykorzystano do modyfikacji i tworzenia adsorbentów oraz flokulantów, które mają za zadanie usuwanie szkodliwych barwników organicznych z odpadów przemysłowych, szczególnie z przemysłu tekstylnego, barwnikarskiego, drukarskiego i malarskiego. Roy i in. zmodyfikowali celulozę we włóknach jutowych za pomocą taniny polifenolowej w środowisku wodnym, ułatwione przez aktywację epoksydową. Ta modyfikacja miała na celu adsorpcję Czerwieni Kongo (barwnika) z roztworu wodnego. Po modyfikacji pojemność adsorpcyjna zmodyfikowanych włókien jutowych była znacznie wyższa niż niezmodyfikowanych włókien jutowych [118]. Szczepione kopolimery celulozowe wykorzystano jako adsorbent w procesach oczyszczania ścieków. W pracy Lee i in. zastosowano celulozę szczepioną PAA, którą określono jako doskonały adsorbent o wysokiej wydajności flokulacji [[119].

Poza możliwością usuwania barwnika poprzez adsorpcję, szczepione materiały celulozowe znalazły zastosowanie w sorpcji jonów metali. Jony takie jak:  $Cd^{2+}$ ,  $Pd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $As^{3+}$ ,  $Mo^{2+}$ ,  $V^{3+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Sb^{3+}$  nie degradują się i stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ze względu na toksyczność. Źródłem zanieczyszczenia są zakłady elektrochemiczne, garbnicze, elektroniczne, obróbki i przetwórstwa metali oraz farbiarskie [106]. Zastosowanie biosorbentów stanowi alternatywę dla szerokiego spektrum strategii i metod usuwania jonów metali ze środowiska ze względu na biodegradowalność, stabilność i możliwość ponownego użycia. Materiały te są naturalne oraz tanie

i oferują wysoki stopień adsorpcji przy łatwej desorpcji celem odzysku jonów [[120]. Przykładem wykorzystania szczepionej celulozy jest praca Chauhan i in., którzy przeprowadzili sorpcję jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przy użyciu celulozy szczepionej oraz niezmodyfikowanej. Szczepienie celulozy w znaczny sposób poprawiało sorpcję jonów metalu. Metoda szczepienia, modyfikacji materiału miała również istotny wpływ na właściwości sorpcyjne. Przy identycznej wydajności szczepienia, materiał zmodyfikowany przy użyciu metody gamma oferował trzykrotnie wyższe właściwości sorpcyjne względem materiału szczepionego metodą kopolimeryzacji z reakcją redoks z użyciem nadsiarczanu jako inicjatora [121].

Podobnie jak materiały uzyskane na drodze impregnacji, tak i materiały uzyskane ze szczepienia chemicznego są wykorzystywane do produkcji aktywnych materiałów do pakowania żywności. Przykładowo zaprezentowano modyfikację standardowego papieru do kopiarki poprzez pokrycie go zaszczeplonym lateksem z wosku pszczelego. Zmodyfikowany lateks uzyskano poprzez szczepienie polimeru na bazie guanidyny o właściwościach antybakteryjnych na powierzchni lateksu z wosku pszczelego. Uzyskany w ten sposób dodatek do papieru zwiększył jego odporność na działanie pary wodnej, jak i nadał mu właściwości antybakteryjne [122].

Również w celu nadania właściwości antybakteryjnych Tankhiwale i in. zaszczepili akryloamid na powierzchni filtra celulozowego poprzez kopolimeryzację inicjowaną azotem cerowo-amonowym. Na uzyskanej powierzchni uwięziono później nanocząstki srebra. Uzyskany materiał wykazywał silne właściwości antybakteryjne przeciw szczepowi *E. coli* [[123].

Wu i in. wykorzystali utlenioną celulozę jako matrycę do zaszczepienia do niej chitozanu. Uzyskany materiał był bezpieczny dla człowieka, biodegradowalny i miał właściwości antybakteryjne przeciw szczepom *E. coli* i *S. aureus*. Co więcej, wykazywał on 80% transmitancję i doskonałą nieprzepuszczalnością wobec tlenu. Uzyskany kompozyt zabijał powyżej 99% bakterii przytwierdzonych do powierzchni i był w stanie wydłużyć okres przydatności do spożycia kiełbasy o 6 dni. Powyższe właściwości uzyskano kosztem niewielkiego pogorszenia właściwości mechanicznych względem materiału celulozowego. Wytworzony materiał celulozowo-chitozanowy ma zalety obu komponentów, z których został wyprodukowany [124].

Dong i in. wytworzyli bioaktywny papier poprzez zaszczepienie do włókien celulozowych  $\beta$ -cyklodekstryny z pomocą kwasu cytrynowego. Wykorzystując kompleks inkluzyjny  $\beta$ -cyklodekstryna-chlorowodorek cyprofloksacyny (antybiotyk) uzyskano materiał o doskonałych właściwościach antybakteryjnych przeciw szczepom *E. coli* i *S. aureus* [125].

Możliwe zatem jest uzyskanie materiałów przeznaczonych do pakowania, które są biodegradowalne, pochodzenia naturalnego oraz o właściwościach antybakteryjnych przy zachowaniu pierwotnej wytrzymałości mechanicznej materiału.

## 1.7 Cel i znaczenie pracy; hipotezy badawcze

### 1.7.1 Określenie głównego celu badawczego

Celem badań jest rozwój procesów impregnacji i szczepienia w fazie nadkrytycznego ditlenku węgla do produkcji materiałów o właściwościach antybakteryjnych i antibiofilmowych na bazie octanu celulozy, poliamidu, skrobi i chitozanu, oraz karwakrolu i czwartorzędowych związków amoniowych jako substancji aktywnych. Następujące hipotezy związane z wykorzystaniem zaproponowanych metod zostały postawione:

1. Możliwa jest modyfikacja komercyjnych membran mikrofiltracyjnych z poliamidu i octanu celulozy za pomocą karwakrolu z użyciem metody impregnacji nadkrytycznej (SSI) z nadkrytycznym ditlenkiem węgla. Zmodyfikowane membrany nabiorą właściwości antybakteryjne i antibiofilmowe, przy zachowaniu funkcjonalności i właściwości strukturalnych.
2. Możliwe jest modyfikowanie wybranych polimerów i kompozytów polimerowych zawierających grupy hydroksylowe czwartorzędowymi związkami amoniowymi poprzez szczepienie w nadkrytycznym ditlenku węgla w celu uzyskania nowych materiałów o właściwościach antibiofilmowych.

### 1.7.2 Wskazanie potencjalnych kontrybucji do literatury naukowej i przemysłowej

Badania przeprowadzone w ramach doktoratu skupiają się na eksplorowaniu nowatorskich metod modyfikacji materiałów w celu nadania im właściwości antybakteryjnych i antibiofilmowych o potencjale w zastosowaniu ich w różnych gałęziach przemysłu i w medycynie. Przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu zrozumienie wpływu parametrów procesowych na uzyskany produkt i charakterystykę otrzymanego materiału oraz ocenę ich skuteczności w zwalczaniu biofilmu.

W pracy doktorskiej wykorzystywano metody wysokociśnieniowe z użyciem nadkrytycznego ditlenku węgla. Metody te w trakcie modyfikacji materiałów polimerowych nie wymagają produkcji ścieków. Przedstawione więc zostaną metody wpisujące się w trend zielonej chemii. Stosowanie metod wysokociśnieniowych pozwala również skrócić potrzebny czas na modyfikację, co czyni te metody atrakcyjnymi w komercyjnym użyciu.

Wyniki badań dotyczących impregnacji membran polimerowych pozwalają zrozumieć wpływ parametrów procesowych takich jak ciśnienie na stopień impregnacji, co przekłada się na właściwości bakteriobójczych membran wobec patogenów takich jak m.in. *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Modyfikacja materiału może mieć wpływ na jego strukturę, która w dalszej kolejności będzie miała wpływ na jego przydatność w procesach przemysłowych. Przedstawione badania stawiają granice w modyfikacji, przed którymi możliwe jest zachowanie funkcjonalności materiału polimerowego.

Co więcej, badania nad szczepieniem nadkrytycznym membran i granulek octanu celulozy i blendu skrobiowo-chitozanowego za pomocą techniki wysokociśnieniowej dostarczają technologii, która umożliwia tworzenie materiałów o długotrwałych właściwościach antybiofilmowych. Powierzchnie o tych właściwościach są pożądane w procesach przemysłowych, marynarce czy w medycynie jako pewna i stabilna metoda prewencji przeciw tworzeniu biofilmu.

Wnioski z tych badań mogą stanowić istotny wkład w rozwój technik wysokociśnieniowych w ramach inżynierii chemicznej w celu produkcji nowych materiałów o właściwościach antybakteryjnych lub antybiofilmowych, które mogą znaleźć zastosowanie w szerokim zakresie aplikacji takich jak: przemysł medyczny, filtracja wody, opakowania żywności, systemy oczyszczania powietrza.

## 1.8 Przedstawienie zawartości pracy

Praca składa się z czterech głównych rozdziałów nazwanych jako: 1. Wstęp, 2. Część eksperymentalna, 3. Rezultaty i wnioski, 4. Podsumowanie. W dalszej kolejności przedstawiono rozdziały: 5. Bibliografia, 6. Spis rysunków i zdjęć oraz 7. Spis tabel. Osobno udostępniony jest załącznik, w którym przedstawione zostały dodatkowe wykresy, rysunki uzupełniające dane i wyniki przedstawione w niniejszej pracy.

W Części eksperymentalnej przedstawiono: materiały użyte w badaniach przedstawionych w części eksperymentalnej wraz z aparaturą procesową (Rozdziały 2.1-2.2). W Rozdziale 2.3 Opisano metody badawcze zastosowane w części eksperymentalnej odnoszącej się do metody impregnacji nadkrytycznej. W kolejnym, Rozdziale 2.4 przedstawiono metody badawcze zastosowane w części eksperymentalnej odnoszącej się do metody szczepienia nadkrytycznego. W ostatnim Rozdziale 2.5 przedstawiono zbiorczo metody charakteryzacji materiałów dla obu metod modyfikacji.

Rozdział 3 przedstawia rezultaty badań, których metody zostały opisane w Rozdziale 2. Rozdział 3.1.1 opisuje rezultaty impregnacji poliamidu, zaś Rozdział 3.1.2 rezultaty impregnacji octanu celulozy. Rozdział 3.1 zakończono wnioskami (Rozdział 3.1.3). W Rozdziale 3.2 przedstawiono rezultaty związane ze szczepieniem w fazie nadkrytycznej materiałów: octanu celulozy i blendów skrobiowo-chitozanowych, który zakończono wnioskami (Rozdział 3.2.5).

W Rozdziale 4 podsumowano wyniki w odniesieniu do postawionych hipotez i celów badawczych.

Na końcu pracy przedstawiono bibliografię, spis rysunków, zdjęć i tabel. Do pracy dołączono załącznik z dodatkowymi rysunkami oraz tabelami.

## 2 Część eksperymentalna

W Rozdziale 2 przedstawione są materiały użyte do eksperymentów (Rozdział 2.1), aparatura wysokociśnieniowa użyta do eksperymentów z nadkrytycznym ditlenkiem węgla (Rozdział 2.2), metody związane z impregnacją nadkrytyczną (Rozdział 2.3) oraz reakcjami szczepienia nadkrytycznego (Rozdział 2.4) i testowaniem otrzymanych materiałów. W Rozdziale 2.5 zaprezentowane są metody charakteryzacji otrzymanych i badanych materiałów.

### 2.1 Materiały

Niniejszy rozdział przedstawia listę materiałów użytych w części eksperymentalnej. Lista ta jest przedstawiona poniżej w Tabeli 2.1.

Tabela 2. 1 Lista materiałów użytych w badaniach rozprawy doktorskiej

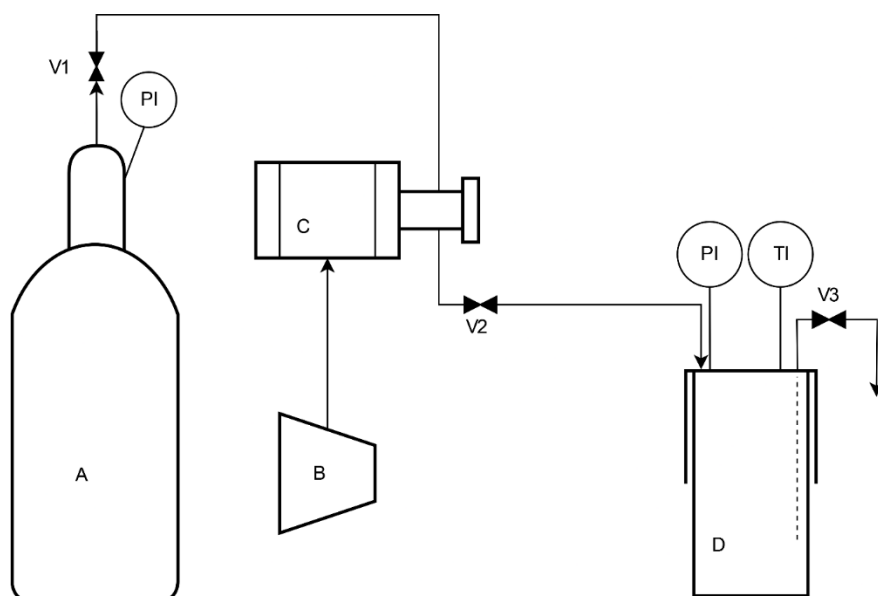
Nazwa	Producent	Parametry
11-bromo-1-undekanol	Sigma-Aldrich, Niemcy	czystość $\geq$ 99,0%
1-bromoundekan	Sigma-Aldrich, Niemcy	czystość 98%
1-propanol	Chempur, Polska	czda
2-dimetyloaminoetanol	Sigma-Aldrich, Niemcy	czystość $\geq$ 99,5%
Aceton	StanLab, Polska	Czda
Gliceryna bezwodna	Poch, Gliwice, Polska	
Chitozan	Sigma Aldrich	Wysoka masa cząsteczkowa, 75% deacetylowany
Chloroform-D	Sigma-Aldrich, Niemcy	czystość 99,8%
Diizocyjanian heksametylenu	Sigma-Aldrich, Niemcy	czystość $\geq$ 98,0%
Dilaurynian dibutylocyny	Sigma-Aldrich, Niemcy	czystość 95%
Ditlenek węgla	SIAD, Polska	czystość $\geq$ 99,5%
Etanol	P.P.H. Stanlab, Polska	czystość 96%; czda
Eter dietylowy	POCH Avantor Performance Materials, Polska	czda
Karwakrol	Sigma-Aldrich z Niemiec	czystość $\geq$ 98%
Kwas octowy	Poch, Gliwice, Polska	czystość 99,5-99,9%
Membrany do mikrofiltracji z octanu celulozy	Cytiva Whatman <sup>TM</sup> , Niemcy; zakupione od Sigma-Aldrich	średniej wielkości porów 0,2 $\mu$ m i średnicy membrany 47 mm



Membrany poliamidowe do mikrofiltracji (numer katalogowy: WHA10414012)	GE Healthcare Whatman™ z Niemiec; zakupione od Sigma-Aldrich	wielkości porów wynoszącej 0,2 $\mu\text{m}$ i średnicy membrany 47 mm
Metanol	POCH Avantor Performance Materials, Polska	Czda
N,N-dimetylotetradecyloamina	Sigma-Aldrich, Niemcy	czystość $\geq 95\%$
Octan celulozy	Sigma-Aldrich, Niemcy	Mn $\sim 30\ 000$ ; w postaci proszku
Octan celulozy Eastman CA-320S	Safic-Alcan, Polska	Produkt w postaci kulek
Skrobia ziemniaczana	PPZ Trzemeszno, Polska	

## 2.2 Aparatura wysokociśnieniowa

Wszystkie eksperymenty związane z modyfikacją materiałów metodami wysokociśnieniowymi przeprowadzono przy użyciu aparatury znajdującej się w laboratorium wysokociśnieniowym Wydziału Chemicznego na Politechnice Wrocławskiej. Eksperymenty te obejmowały użycie dwóch naczyń wysokociśnieniowych HPE-500 i HPVC 350 (Eurotechnica GmbH, Bargteheide, Niemcy) o pojemności kolejno 280 mL i 25 mL. Schemat układu eksperymentalnego jest przedstawiony na Rysunku 2.1.



Rysunek 2. 1 Schemat aparatury wysokociśnieniowej składający się z: A – butli CO<sub>2</sub>, B – kompresora powietrza, C – kompresora wysokociśnieniowego, D – naczynia wysokociśnieniowego.

Zestaw składa się z butli ditlenku węgla (CO<sub>2</sub>) (A), kompresora wysokociśnieniowego (C) (Typ: 07KN2, Eurotechnica GmbH, Niemcy), który dostarcza ditlenek węgla do naczynia wysokociśnieniowego (D) o pojemności 280 mL (Zdjęcie 2.1a) lub 25 mL (Zdjęcie 2.1b) i sprężarki powietrza (B), która zasila

kompresor wysokociśnieniowy. Sprężanie CO<sub>2</sub> w kompresorze umożliwia osiągnięcie wymaganego ciśnienia w naczyniu wysokociśnieniowym, gdzie przeprowadza się eksperymenty.

Naczynie wysokociśnieniowe HPE-500 (Eurotechnica GmbH; maksymalne ciśnienie 500 barów; maksymalna temperatura 120°C) o pojemności 280 mL jest wyposażone w płaszcz grzewczy, który podgrzewany jest przez cyrkulacyjną łaźnię wodną modelu RW3-0525 (JeioTech, Kora). Konstrukcja naczynia umożliwia ustawienie jej w położeniu poziomym lub pionowym. Wszystkie eksperymenty z użyciem reaktora HPE-500 przeprowadzono w trybie poziomym, zgodnie z przedstawieniem na Zdjęciu 2.1a.

Naczynie wysokociśnieniowe HPVC 350 o pojemności 25 mL (Eurotechnica GmbH; maksymalne ciśnienie 350 barów; maksymalna temperatura 150°C) to komora widokowa wyposażona w dwa szafirowe okna o średnicy 18 mm, co pozwala na obserwację procesu zachodzącego w jej wnętrzu. Komora jest wyposażona w płaszcz grzewczy zasilany elektrycznie, co umożliwia skonfigurowanie i regulację temperatury wewnątrz reaktora. Zdjęcie naczynia wysokociśnieniowego przedstawiono na Zdjęciu 2.1b



(a)



(b)

Zdjęcie 2. 1 Naczynie wysokociśnieniowe HPE-500 o pojemności 280 mL (a); Naczynie wysokociśnieniowe model HPVC 350 o pojemności 25 mL (b)

Oba reaktory są wyposażone w precyzyjne wskaźniki temperatury – termopary oraz ciśnienia – manometry, umożliwiające dokładną kontrolę warunków eksperymentalnych.

### 2.3 Impregnacja nadkrytyczna – metody

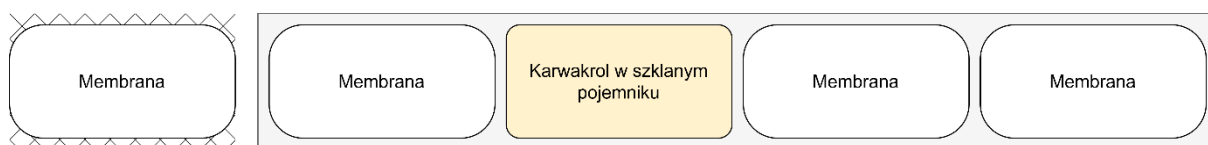
Rozdział 2.3 dotyczy wykonanych metod dotyczących badań związanych z impregnacją nadkrytyczną karwakrolem membran z octanu celulozy oraz poliamidu. Metody te będą dotyczyć modyfikacji otrzymanych materiałów oraz dalszych badań określających zdolności membran do filtracji. Przedstawione zostanie modelowanie matematyczne strumienia permeatu przez membrany zaimpregnowane, jak i niezmodyfikowane, dzięki czemu możliwe jest opisanie wpływu obecności karwakrolu na sposób

depozycji bakterii na powierzchni membrany w trakcie filtracji krzyżowej. Przedstawione zostaną metody testujące ich potencjalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

### 2.3.1 Impregnacja nadkrytyczna karwakralem

W procesie impregnacji nadkrytycznej membran poliamidowych i octanu celulozy przy użyciu karwakraolu zastosowano wysokociśnieniowe naczynie o pojemności 280 mL, wyposażone w płaszcz grzewczy. Do ogrzewania użyto wody, która pełniła funkcję płynu grzewczego, a jej obieg był zapewniany przez cyrkulator łaźni grzewczej.

Procedurę impregnacji nadkrytycznej rozpoczęto, umieszczając około 2 mL karwakraolu w szklanym pojemniku na środku metalowej tacki. Powierzchnia kontaktu lustra cieczy karwakraolu wynosiła 7,6 cm<sup>2</sup>. Następnie cztery membrany poliamidowe lub cztery octanu celulozy zostały ułożone symetrycznie względem karwakraolu – dwie po lewej i dwie po prawej stronie, zgodnie z przedstawieniem na Rysunku 2.2. Membrany i naczynie z karwakraolem zostały umieszczone w naczyniu wysokociśnieniowym. Masa użytych membran wynosiła odpowiednio około 0,07 g dla poliamidowych i 0,1 g dla z octanu celulozy.



Rysunek 2. 2 Położenie membran oraz naczynia z karwakraolem w procesie impregnacji nadkrytycznej

Następnie do naczynia wprowadzono CO<sub>2</sub>, aż do osiągnięcia równowagi ciśnienia z poziomem ciśnienia w butli z CO<sub>2</sub>. Po osiągnięciu temperatury roboczej CO<sub>2</sub> był wprowadzany do układu za pomocą napędzanego powietrzem kompresora wysokociśnieniowego, aż do uzyskania docelowego ciśnienia roboczego.

Po zakończeniu zaplanowanego czasu impregnacji układ został poddany dekompresji, utrzymując średnią szybkość dekompresji na poziomie 0,25 MPa/min. Eksperymenty przeprowadzono w temperaturze 40°C przy ciśnieniach wynoszących 10, 15 i 20 MPa. Czas impregnacji wahał się w zakresie od 0,5 do 6 godzin. Dobór parametrów procesu, takich jak temperatura i szybkość dekompresji, został oparty na wynikach wcześniejszych doświadczeń wstępnych. Analiza wykazała, że temperatura 50°C prowadzi do wolniejszej kinetyki impregnacji. Niewielka szybkość dekompresji nie miała istotnego wpływu na efektywność procesu impregnacji, natomiast zbyt szybka dekompresja została wykluczona ze względu na potencjalne negatywne skutki dla mikrostruktury membrany. Dodatkowo celowe spowolnienie procesu dekompresji miało na celu zabezpieczenie substancji aktywnej w strukturze membrany oraz uniknięcie ewentualnego zdmuchnięcia membran z metalowej tacki.

Wydajność impregnacji karwakralem (załadowanie) została dokładnie określona grawimetrycznie i obliczona przy użyciu poniższego równania matematycznego:

$$I = \frac{m_{carv}}{m_{im}} \cdot 100\% \quad (2.1)$$

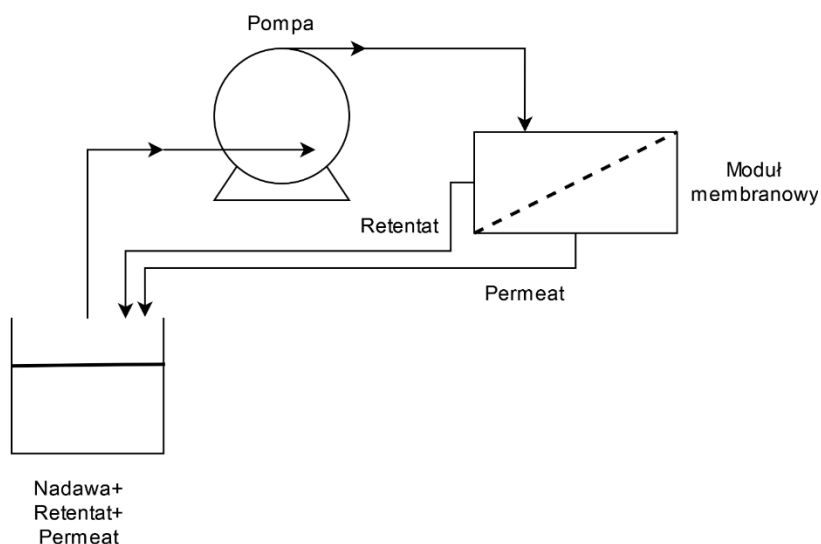
gdzie  $m_{carv}$  jest masą zaimpregnowanego karwakrału, otrzymaną jako różnica mas między membraną zaimpregnowaną i niezmodyfikowaną, zaś  $m_{im}$  to masa membrany zaimpregnowanej. W trakcie pracy wykorzystywano wagę analityczną firmy OHAUS Europe GmbH [model PX125DM, Szwajcaria], posiadającą certyfikowaną dokładność do 0,0001 g. Eksperymenty przeprowadzono w co najmniej trzech powtórzeniach, a odchylenie standardowe obliczono według następującego wzoru:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(Y_i - Y_{av})^2}{N}} \quad (2.2)$$

gdzie  $Y_i$  to wartość zmiennej (załadowanie karwakralem) otrzymanej w eksperymencie i  $Y_{av}$  to średnia wartość zmiennej, zaś  $N$  to liczba eksperymentów.

### 2.3.2 Filtracja krzyżowa

Badania wpływu pęcznienia membrany wskutek impregnacji karwakralem obejmowały analizę strumienia permeatu poprzez membranę z octanu celulozy lub z poliamidu, zarówno zaimpregnowane, jak i niezaimpregnowane, w systemie filtracji krzyżowej. Eksperymenty przeprowadzono wykorzystując zestaw składający się z pompy zębatej Cole Parmer 75,211–15 (Vernon Hills, IL, USA), stalowego modułu filtracyjnego i manometru. Filtracja krzyżowa była możliwa dzięki dławieniu strumienia retentatu, co skutkowało wytworzeniem ciśnienia transmembranowego. W celu uzyskania wartości oporu membran z octanu celulozy zmierzono wartość strumienia permeatu wody destylowanej przy różnych ciśnieniach transmembranowych, obejmujących zakres od 10 do 70 kPa. W przypadku membran poliamidowych mierzono strumień permeatu dla ciśnień transmembranowych w zakresie 5-20 kPa. Schemat użytego zestawu do przeprowadzenia tych eksperymentów został zobrazowany na Rysunku 2.3.



Rysunek 2. 3 Zestaw do filtracji krzyżowej.

Podobny układ, przedstawiony na Rysunku 2.3, został wykorzystany do badania osadzania się bakterii na membranach z octanu celulozy podczas filtracji krzyżowej roztworu bakterii *S. aureus*. W każdym eksperymencie użyto 300 mL świeżego roztworu bakterii o stężeniu  $1-2 \cdot 10^8$  CFU/mL. Cyrkulacja roztworu odbywała się pod stałym ciśnieniem transmembranowym wynoszącym 55 kPa przez 30 min. Prędkość liniowa cieczy w przewodzie prowadzącym do membrany wynosiła 0,33 m/s, natomiast średnia prędkość liniowa nad membraną oscylowała w okolicach 0,007 m/s.

Dodatkowo w celu określenia ściślności zdeponowanych bakterii na powierzchni membrany, przeprowadzono dodatkową serię. W tym celu użyto niezmodyfikowaną membranę z octanu celulozy i filtrowano w systemie filtracji krzyżowej roztwór bakterii o stężeniu  $1-2 \cdot 10^8$  CFU/mL przez 30 minut przy stałym ciśnieniu transmembranowym wynoszącym 55 kPa. W kolejnym kroku przeprowadzono testy z użyciem wody destylowanej oraz membrany z warstwą zdeponowanych bakterii na powierzchni. Przeprowadzono filtrację krzyżową badając przepływ permeatu w funkcji ciśnienia transmembranowego, zmieniającego się w zakresie od 10 do 70 kPa.

### 2.3.3 Modelowanie matematyczne filtracji krzyżowej

W trakcie eksperymentu filtracji krzyżowej roztworu *S. aureus* przez membranę octanu celulozy zauważono, że wartość strumienia permeatu nie osiąga wartości zerowej, lecz pewną ustaloną wartość. W związku z tym zdecydowano się wybrać model matematyczny, który opisuje spadek wartości permeatu w czasie (Równanie 1.1).

W Tabeli 1.1 przedstawiono wartości parametru  $n$  z Równania 1.1 odpowiadającemu konkretnemu modelowi blokowania membrany. Na Rysunku 1.1 przedstawiono graficznie sposób blokowania porów membrany przez bakterie dla każdego przypadku rozważanego w wykorzystanym modelu.

Rozważane było wykorzystanie modelu, który by łączył dwa modele blokowania membrany jednocześnie. Taki model zaproponował Bolton i in. [126]. Jednakże model ten zakłada spadek wartości strumienia permeatu w czasie do zera. W związku z tym wybór tego modelu jest nieodpowiedni, ponieważ jego założenia nie są kompatybilne z otrzymanymi danymi eksperymentalnymi, w których końcowy strumień permeatu był ustalony.

Rozwiązane Równania 1.1 dla każdego modelu blokowania membrany zostały przedstawione w Tabeli 2.2 [27], [127].

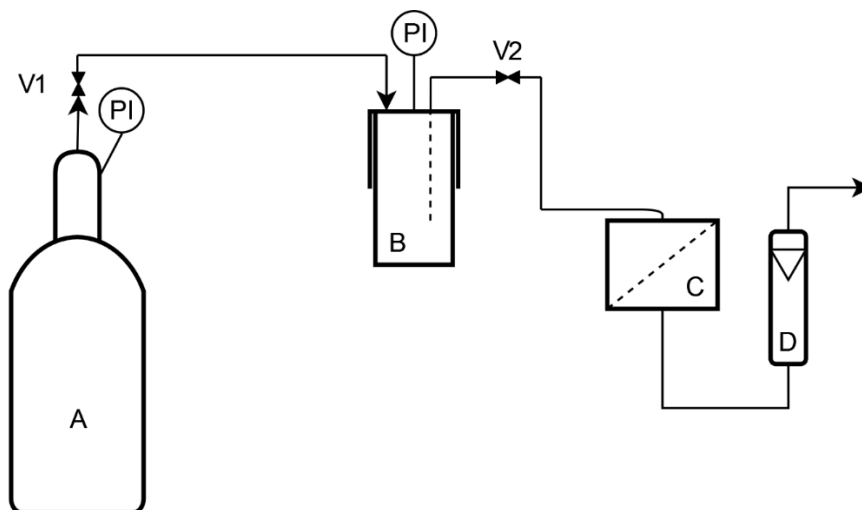
Tabela 2. 2 Rozwiązania równania 3 dla filtracji krzyżowej pod stałym ciśnieniem

Model blokowania membrany	Parametr n	Rozwiązane równanie
Całkowite blokowanie	2	$J(t) = J^* + (J_0 - J^*)e^{-K_{CPB} \cdot t}$
Standardowe blokowanie	1.5	$J(t) = J^* \frac{\left(-1 + e^{\sqrt{J^*} K_{SPB} \cdot t} \left(1 + \sqrt{\frac{J_0}{J^*}}\right) + \sqrt{\frac{J_0}{J^*}}\right)^2}{\left(1 + e^{\sqrt{J^*} K_{SPB} \cdot t} \left(1 + \sqrt{\frac{J_0}{J^*}}\right) - \sqrt{\frac{J_0}{J^*}}\right)^2}$
Pośrednie blokowanie	1	$J(t) = \frac{J_0 \cdot J^* \cdot e^{K_{IPB} \cdot J^* \cdot t}}{J^* + J_0 \cdot (e^{K_{IPB} \cdot J^* \cdot t} - 1)}$
Filtracja plackowa	0	$t = \frac{1}{K_{CLF} \cdot J^{*2}} \left( \ln \left( \frac{J(t)}{J_0} \cdot \frac{(J_0 - J^*)}{(J(t) - J^*)} \right) - J^* \cdot \left( \frac{1}{J(t)} - \frac{1}{J_0} \right) \right)$

Dopasowanie trzech przypadków (n = 2, 3/2 i 1) do danych eksperymentalnych przeprowadzono w Mathematica przy użyciu wbudowanej funkcji NonlinearModelFit oraz w programie Matlab R2023a przy pomocy wbudowanej wtyczki Curve Fitting. Dopasowanie w przypadku dla modelu filtracji plackowej (n = 0) zostało wykonane przez rozwiązanie Równania 1.1 metodą numeryczną przy użyciu metody Nelder – Mead (simplex). Wykorzystanie równania dla n = 0 pokazanego w Tabeli 2.2 nie było możliwe, ponieważ w naszych danych strumień osiągnął stałą, ustaloną wartość.

### 2.3.4 Uwalnianie karwakrołu z membran do ditlenku węgla w fazie gazowej

Stalowy moduł filtracyjny wykorzystany w zestawie do filtracji krzyżowej został wykorzystany do zbadania uwalniania karwakrołu z membran poliamidowych do ditlenku węgla w fazie gazowej. Stalowy moduł filtracyjny (C) został podłączony do naczynia wysokociśnieniowego o pojemności 280 mL w sposób przedstawiony na Rysunku 2.4.



Rysunek 2. 4 Zestaw do pomiaru uwalniania karwakrołu z membran poliamidowych do ditlenku węgla: A – butla CO<sub>2</sub>, B – naczynie wysokociśnieniowe o pojemności 280 mL, C – filtracyjny moduł stalowy z membraną, D – rotametr.

Naczynie wysokociśnieniowe o objętości 280 mL (B) zostało napełnione ditlenkiem węgla z butli CO<sub>2</sub> (A) do ciśnienia 2,5 MPa. Zainicjowano przepływ ditlenku węgla przez układ poprzez otwarcie zaworu V2 i regulowano jego otwarcie w taki sposób, by utrzymywać stały przepływ 5 L/min przez zaimpregnowaną membranę poliamidową. Wybór natężenia przepływu ditlenku węgla przez membranę wynikał z przeprowadzonego przeglądu literaturowego. Przykładowo stwierdzono, że w Japonii stosuje się w trakcie przeprowadzania operacji z otwartymi ranami nadmuchiwanie otwartych ran chirurgicznych w przepływie w przedziale od 2 do 5 L/min [128]. Inne badania wykazały, że interesujące szybkości przepływu to 2–10 L/min [129], 5 i 10 L/min [130], 5 L/min [131] i 10 L/min [132].

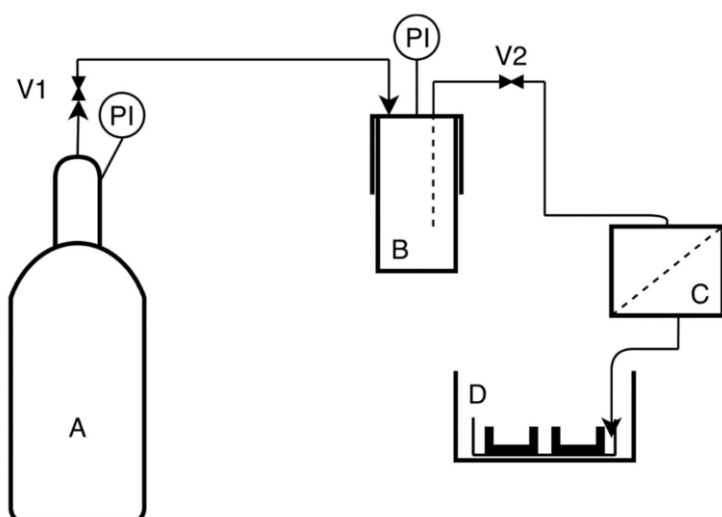
Pomiar przepływu umożliwił rotametr (D) znajdujący się za membraną w module filtracyjnym (C). Uwalnianie karwakrołu monitorowano gravimetrycznie, oznaczając ilościowo masę membrany w określonych odstępach czasu.

### 2.3.5 Model klatki piersiowej

W chirurgii na otwartym sercu powszechnie stosuje się procedurę napowietrzania otwartej jamy klatki piersiowej czystym ditlenkiem węgla, celem prewencji przed zatorowością tętniczą [129]. Badania przeprowadzone wcześniej potwierdziły, że omawiany zabieg skutecznie zapobiega również zakażeniu otwartych ran chirurgicznych w okresie okołoperacyjnym [130], [132]. Pomimo tych działań profilaktycznych, zakażenia chirurgiczne pozostają stosunkowo częstym zjawiskiem, występującym w około 5% przypadków. W celu minimalizacji ryzyka zakażenia chirurgicznego zaproponowano zastosowanie membrany zaimpregnowanej karwakrolem jako filtra antybakteryjnego. W tym kontekście opracowano model otwartej jamy klatki piersiowej, analogiczny do tego używanego przez Perssona i van der Lindena [130]. Model ten został wykorzystany do przeprowadzenia porównań dotyczących poziomu kontaminacji w przypadkach:

- z użyciem membrany poliamidowej zaimpregnowanej karwakralem,
- z użyciem membrany poliamidowej niezaimpregnowanej karwakralem,
- grupy kontrolnej w której nie wdmuchiwało się dwutlenku węgla.

Protokół eksperymentalny nawiązuje do wykonanego badania przez Perssona i Lindena [130]. Warunki laboratoryjne charakteryzowały się pomieszczeniem z zamkniętymi oknami, gdzie jedna osoba wykonywała czynności, nie pochylając się nad modelem. Bakterie unoszące się w powietrzu wychwytywano na dwóch standardowych płytkach agarowych z krwią o średnicy 9 cm, które pełniły funkcję pożywki. Rysunek 2.5 ilustruje schemat przedstawiający układ doświadczalny. Układ ten składa się z butli (oznaczonej literą A) zawierającej sprężony dwutlenek węgla, która jest połączona z naczyniem wysokociśnieniowym (oznaczonym literą B). Zarówno naczynie wysokociśnieniowe, jak i butla, posiadają dokładne manometry do pomiaru ciśnienia. Stalowy moduł filtracyjny (oznaczony literą C) jest przyłączony do naczynia wysokociśnieniowego, natomiast przewód permeatu jest umieszczony w modelu otwartej klatki piersiowej (oznaczonym literą D).



Rysunek 2. 5 Zestaw do badania wpływu wdmuchiwania dwutlenku węgla na zakażenie bakteriami modelu otwartej klatki piersiowej. Zestaw składa się z: A - butla CO<sub>2</sub>, B - naczynie wysokociśnieniowe, C - stalowy moduł filtracyjny, D - model otwartej klatki piersiowej.

Model otwartej jamy klatki piersiowej mieszczący płytki z pożywką miał owalny o wymiarach: 23 cm długości, 15 cm szerokości i 6 cm wysokości. Model umieszczony był na stole wzniesionym 50 cm nad ziemią w plastikowej obudowie o wymiarach 35 cm długości, 28 cm szerokości i 22 cm wysokości. Obudowa ta uniemożliwiała personelowi zbliżenie się do modelu. Tubę z otwartym końcem skierowano w stronę środka modelu [130]. Przed każdym eksperymentem plastikowy model, moduł filtracyjny na membrany i wszystkie rurki sterylizowano etanolem. Zdjęcie zestawu eksperymentalnego przedstawia Zdjęcie 2.2.





Zdjęcie 2. 2 Zestaw eksperymentalny wdmuchiwania ditlenku węgla do modelu klatki piersiowej z wykorzystaniem modułu filtracyjnego z membraną zaimpregnowaną karwakraolem. Na zdjęciu widoczne są dwie płytki z pożywką agarową

Każdy z eksperymentów rozpoczęto od wdmuchiwania ditlenku węgla w kierunku modelu przez dwie minuty, po czym osoba z założonymi sterylnymi rękawiczkami otwierała płytki agarowe. Po jednej godzinie przepływu gazu z szybkością 5 L/min, płytki agarowe zamknięto, utrzymując przepływ gazu. Płytki agarowe przekazywano następnie do analizy. Każdy eksperyment przeprowadzono w co najmniej pięciu powtórzeniach, stosując zarówno niezmodyfikowane membrany poliamidowe, jak i zaimpregnowane membrany zawierające około 30% wagowych karwakraolu. Przeprowadzono również grupę kontrolną polegającą na eksperymencie bez wdmuchiwania ditlenku węgla.

## 2.3.6 Analiza mikrobiologiczna

### 2.3.6.1 Analiza mikrobiologiczna testów filtracji krzyżowej

Testy przeprowadzono z użyciem szczepu *Staphylococcus (S.) aureus* ATCC 29213 (Microbiologics, St. Cloud, MN, USA) na UPWr. W pierwszym kroku przeprowadzono zaszczepienie szczepu na agarze z krwią owczą Columbia 5% (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) oraz inkubacji przez 24 godziny w 37°C. Z uzyskanej kolonii sporządzono zawiesinę OD550 o gęstości 0,08-0,1 (około  $1-2 \cdot 10^8$  CFU/mL) z użyciem sterylnej soli fizjologicznej (0,9 % NaCl). Dla każdego eksperymentu filtracji krzyżowej zastosowano świeże, nowe inokulum. Do każdego eksperymentu stosowano 300 mL inokulum filtrowanego w obiegu zamkniętym przez 30 minut tak jak to przedstawiono w Rozdziale 2.3.2. Po

zakończeniu filtracji krzyżowej, zużyta membrana była umieszczana w roztworze sterylnej soli fizjologicznej (0,9%) i była natychmiastowo wysyłana do analizy cytometrii przepływowej.

Każdy eksperyment był wykonywany dwukrotnie, natomiast dla każdej próby wykonywano 3 pomiary cytometrii przepływowej. Obróbkę membran po eksperymentach filtracyjnych przeprowadzono zgodnie z opisanymi protokołami badania właściwości antydrobnoustrojowych/antibiofilmowych materiałów polimerowych [133]. Przylegające (hipotetyczne) mikroorganizmy do membrany musiały zostać oddzielone w celu zebrania ich oraz zliczenia. W związku z tym roztwór 0,9% NaCl wraz z membraną energicznie wytrząsano w wytrząsarce orbitalnej przez 10 minut przy 200 obr./min. Następnie membrany poddano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 37 000 Hz w kąpeli ultradźwiękowej (Elmasonic S60, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Niemcy). Obróbka ultradźwiękami trwała 5 minut w interwałach nie dłuższych niż 15 sekund na minutę. Było to podyktowane możliwością przegrzania oraz niekorzystnego wpływu na komórki bakterii. W kolejnym kroku ponownie poddano próbkę energicznemu wytrząsaniu przez 10 minut przy 200 obr./min. Następnie zbadano próbkę pod kątem zdolności do życia bakterii, używając zestawu LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Cat. No. l7012, Invitrogen). W celu oczyszczenia inokulum odwirowano je dwukrotnie przy 10 000 xg przez 10 minut ze zmianą supernatantu. Po wykonaniu 100-krotnego rozcieńczenia inokulum zostało zabarwione mieszaniną barwników (SYTO™ 9 Green – kolor zielony – dla żywych komórek, natomiast jodek propidyny – kolor czerwony – dla martwych komórek). Próbki w probówkach typu eppendorf zostały odwirowane przez 5 sekund i pozostawione bez dostępu do światła przez 15 minut w celu nastąpienia pełnego zabarwienia.

Analizę wykonano za pomocą cytometru przepływowego CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA USA) wyposażonego w laser o długości fali 488 nm. Kanały fluorescencyjne zastosowano w następujący sposób: 525/40 BP/FITC dla barwnika SYTO 9 Green i 690/50 BP/PC5.5 dla jodku propidyny. Wartości wzmocnienia podczas eksperymentu wybrano następująco: FSC = 126, SSC = 93, FITC = 15, PC5.5 = 206. Wybrano następujące wartości progowe ustalone podczas eksperymentu: FSC = 2500, PC5,5 = 2500. Natężenie przepływu próbki wynosiło 30  $\mu$ L/min, a objętość 10  $\mu$ l była rejestrowana za każdym razem. Parametr przerwania pracy wynosił poniżej 5%. Korektę wartości uzyskanych dla sterylnej membrany z karwakrolem (kontrola karwakrolu) dokonano za pomocą sterylnej 0,9% NaCl (kontrola solą fizjologiczną). Kalibrację urządzenia przed eksperymentem przeprowadzono także przy użyciu standaryzowanej zawiesiny *S. aureus* ATCC 29213 w dokładnie określonych ilościach (wyznaczono krzywą wzorcową dla  $R^2 = 0,995$ ).

### 2.3.6.2 Analiza mikrobiologiczna modelu klatki piersiowej

Ocenę antybakteryjnego działania wdmuchiwanego CO<sub>2</sub> i karwakrolu przeprowadzono zgodnie z metodologią przedstawioną w Rozdziale 2.3.5 W tym celu wykorzystano płytki Petriego o średnicy 90 mm zawierające 5% agaru z krwią owczą Columbia (produkcji Becton Dickinson, Heidelberg, Niemcy). Procedury badań mikrobiologicznych przeprowadzonych na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności

na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu były zgodne z ogólnymi wytycznymi określonymi w normie EN-ISO 7218:2007/A1:2013 [134]. Po zakończeniu doświadczeń płytki agarowe natychmiast umieszczono w termostacie i inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny w warunkach tlenowych. Następnie wyliczono rozwinięte kolonie.

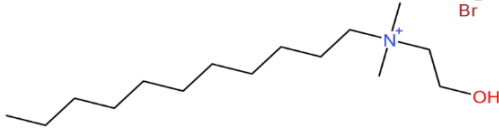
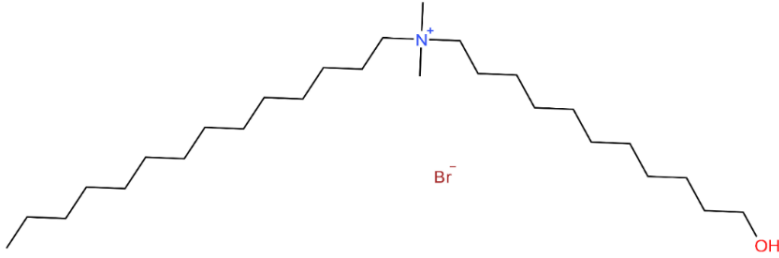
## 2.4 Reakcje szczepienia w fazie nadkrytycznej - metody

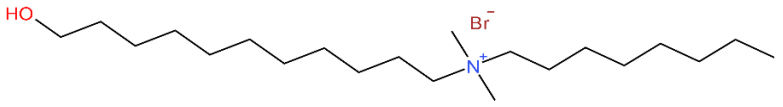
W Rozdziale 2.4 zaprezentowane są metody związane z modyfikacją materiałów metodą szczepienia (graftingu) czwartorzędowych związków amoniowych w płynie nadkrytycznym. Metoda ta jest procesem kowalencyjnego łączenia, tj. szczepienia substancji aktywnej do grup funkcyjnych substancji modyfikowanej. Otrzymane materiały, w przeciwieństwie do opisanej w Rozdziale 2.3 metody impregnacyjnej, otrzymają nowe, długotrwałe właściwości. Niniejszy rozdział zapozna z metodami otrzymywania substancji aktywnych oraz materiałów tj. filmów z octanu celulozy oraz blendów ze skrobi i chitozanu przeznaczonych do modyfikacji. Ukazana zostanie metoda szczepienia nadkrytycznego dla każdego rodzaju materiału. Na końcu zaprezentowane zostaną wybrane metody mikrobiologiczne do zaprezentowania właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

### 2.4.1 Synteza czwartorzędowych związków amoniowych

W niniejszym rozdziale zostaną przedstawione metody syntezy trzech czwartorzędowych związków amoniowych, które zastosowano w reakcji szczepienia w fazie nadkrytycznej. Nazwy związku, stosowany skrót oraz wzory strukturalne zostały przedstawione w Tabeli 2.3.

Tabela 2.3 Zsyntezowane do pracy eksperymentalnej czwartorzędowe związki amoniowe wraz z stosowanym w pracy skrótem oraz wzorem strukturalnym

Nazwa związku	Skrót	Wzór strukturalny
bromek N-(2-hydroksyetylo)-N,N-dimetylundekan-1-aminu	QAC 1	
bromek N-(11-hydroksyundekanylo)-N,N-dimetylotetradekan-1-aminowego	QAC 2	

bromek N-(11- hydroksyundekanylo- N,N-dimetylooktan-1- aminy	N-(11- QAC 3	
--	-----------------	--

Zdjęcie 2.3 ukazuje zestaw aparatury wykorzystanej podczas syntezy czwartorzędowych związków amoniowych składający się z kolby reakcyjnej zanurzonej w łaźni wodnej. W kolbie reakcyjnej umieszczono chłodnicę zwrotną. Łaźnię wodną podgrzewano przy pomocy płyty grzewczej wyposażonej w sondę zewnętrzną. Łaźnia wodna została zabezpieczona srebrną folią w celu ograniczenia utraty ciepła i odparowywania wody.

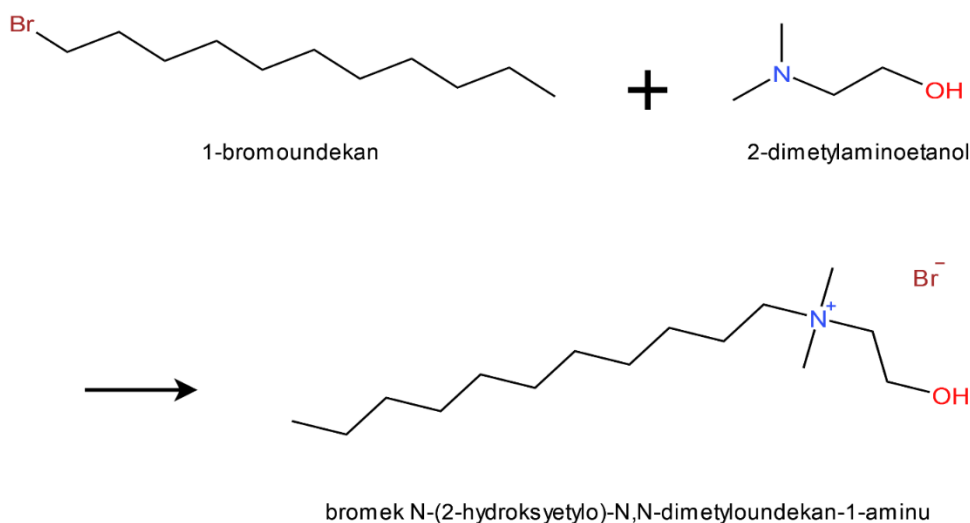


Zdjęcie 2. 3 Użyty zestaw do syntezy czwartorzędowych związków amoniowych

Synteza bromku N-(2-hydroksyetylo)-N,N-dimetyloundekano-1-aminowego (QAC 1)

Schemat reakcji przedstawiono na Rysunku 2.6. QAC 1 zsyntetyzowano z 2-dimetyloaminoetanolu i 1-bromoundekanu zgodnie z wcześniej opisaną metodą [101], [103]. 1,084 g 2-dimetyloaminoetanolu zmieszano z 3,171 g 1-bromoundekanu i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80°C przez 30 minut, co spowodowało zestalenie mieszaniny reakcyjnej. Następnie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej, a następnie dodano 6 mL mieszaniny 1:3 (obj./obj.) propanol:metanol w celu jej całkowitego rozpuszczenia. W następnym etapie ogrzewano mieszaninę pod chłodnicą zwrotną

w temperaturze 80°C przez 20 godzin. Po usunięciu rozpuszczalników na wyparce obrotowej otrzymano białawą substancję. Substancję przemyto trzykrotnie eterem dietylowym i wysuszono pod próżnią, uzyskując białawy proszek.

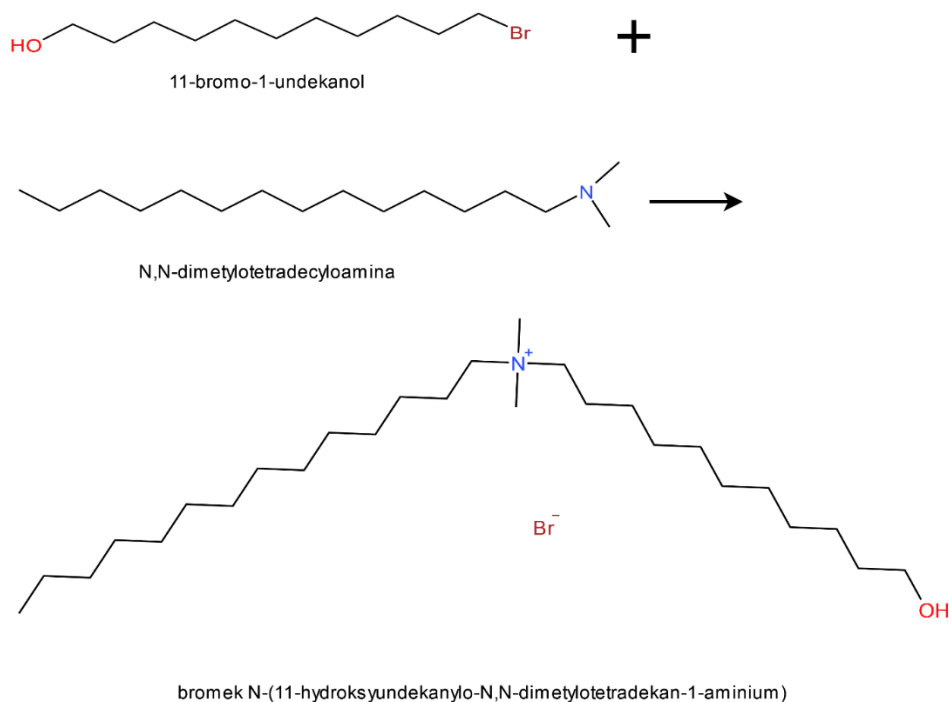


Rysunek 2. 6 Reakcja syntezy QAC 1

Wyniki zleconych badań NMR  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  przedstawiono poniżej:

QAC 1:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$ : 0.85 (t, 3H, J = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>-11), 1.20 – 1.33 (m, 16H, CH<sub>2</sub>-3, CH<sub>2</sub>-4, CH<sub>2</sub>-5, CH<sub>2</sub>-6, CH<sub>2</sub>-7, CH<sub>2</sub>-8, CH<sub>2</sub>-9, CH<sub>2</sub>-10), 1.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-2), 3.34 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-13, CH<sub>3</sub>-14), 3.46 - 3.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-1), 3.57 - 3.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-15), 3.69 - 3.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-16), 4.07 - 4.14 (m, 2H, -OH-17).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$ : 14.2 (C-11), 22.7 (C-10), 22.9 (C-2), 26.3 (C-3), 29.31 (C-5), 29.38 (C-7), 29.4 (C-6), 29.5 (C-8), 29.6 (C-4), 31.9 (C-9), 52.2 (C-13, C-14), 55.9 (C-16), 65.7 (C-1), 66.2 (C-15). Masa molowa: 324,35 g/mol.

Synteza bromku N-(11-hydroksyundekanylo)-N,N-dimetylotetradekane-1-aminowego (QAC 2). Schemat reakcji przedstawiono na Rysunku 2.7. QAC 2 zsyntetyzowano z N,N-dimetylotetradecylodami i 11-bromo-1-undekanolu zgodnie z wcześniej opisaną metodą [101], [103]. 3,045 g 11-bromo-1-undekanolu zmieszano z 3,350 g N,N-dimetylotetradecylodami i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80°C przez 30 minut. Mieszaninę reakcyjną następnie ochłodzono do temperatury pokojowej, a następnie dodano 6 mL mieszaniny 1:3 (obj./obj.) 1-propanol:metanol. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80°C przez 20 godzin i ochłodzono do temperatury pokojowej. Otrzymano białą substancję po usunięciu rozpuszczalników na wyparce obrotowej. Substancję przemyto trzykrotnie eterem dietylowym i wysuszono pod próżnią, uzyskując biały proszek.

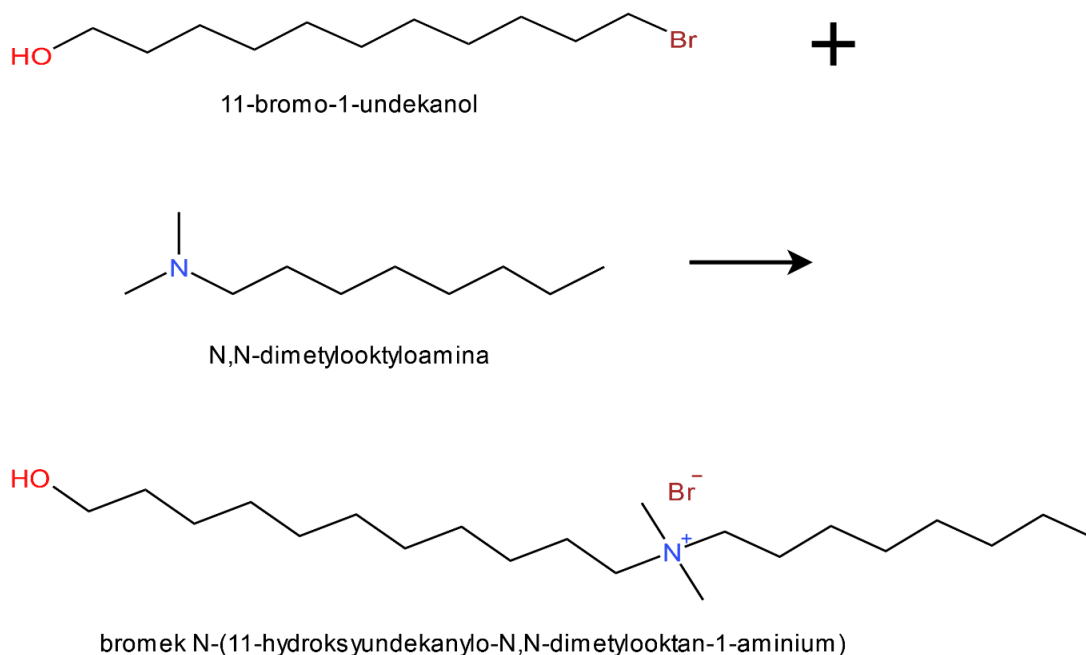


Rysunek 2. 7 Reakcja syntezy QAC 2

Wyniki zleconych badań NMR  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  przedstawiono poniżej:

QAC 2:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$ : 0.83 (t, 3H,  $J = 6.7$  Hz,  $\text{CH}_3$ -15), 1.18 – 1.38 (m, 34H,  $\text{CH}_2$ -4,  $\text{CH}_2$ -5,  $\text{CH}_2$ -6,  $\text{CH}_2$ -7,  $\text{CH}_2$ -8,  $\text{CH}_2$ -9,  $\text{CH}_2$ -10,  $\text{CH}_2$ -11,  $\text{CH}_2$ -12,  $\text{CH}_2$ -13,  $\text{CH}_2$ -18,  $\text{CH}_2$ -19,  $\text{CH}_2$ -20,  $\text{CH}_2$ -21,  $\text{CH}_2$ -22,  $\text{CH}_2$ -24,  $\text{CH}_2$ -25), 1.45 - 1.57 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ -14,  $\text{CH}_2$ -23), 1.59 – 1.72 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ -3,  $\text{CH}_2$ -17), 2.51 (s, 1H, -OH), 3.34 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -27,  $\text{CH}_3$ -28), 3.46 (td,  $J = 10.7, 6.8$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ -2,  $\text{CH}_2$ -16), 3.57 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -26).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$ : 14.19 (C-15), 22.74 (C-14), 22.83 (C-3), 22.86 (C-17), 25.74 (C-4), 26.24 (C-24), 26.33 (C-18), 29.13 (C-6), 29.23 (C-20), 29.26 (C-12, C-23), 29.31 (C-11), 29.39 (C-8), 29.41 (C-22), 29.46 (C-7), 29.54 (C-5), 29.66 (C-9), 29.70 (C-10, C-19), 29.73 (C-21), 31.97 (C-13), 23.79 (C-25), 51.33 (C-27, C-28), 62.78 (C-26), 63.97 (C-2, C-16). Masa molowa: 492.67 g/mol.

Synteza bromku *N*-(11-hydroksyundekanylo-*N,N*-dimetylooktan-1-aminy (QAC 3). Schemat reakcji przedstawiono na Rysunku 2.8. QAC 3 został zsyntezowany z 11-bromo-1-undekanolu oraz *N,N*-dimetylooktyloaminy zgodnie z wcześniej opisaną metodą [101], [103]. 3.040g 11-bromo-1-undekanolu zostało wymieszane z 2,191g *N,N*-dimetylooktyloaminy a następnie ogrzewane pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80°C przez 30 minut. Następnie mieszanina została schłodzona do temperatury pokojowej po czym dodano 6 mL roztworu 1:3 (obj/obj) propanol:metanol. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80°C przez 20 godzin. Po tym czasie mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej. Z uzyskanej mieszaniny odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Uzyskany biały proszek przemyto trzykrotnie eterem dietylowym i wysuszono pod próżnią.



Rysunek 2. 8 Reakcja syntezy QAC 3

Wyniki zleconych badań NMR  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  przedstawiono poniżej:

QAC 3:  $^1\text{H}$  NMR: (400 MHz, CHLOROFORM-D)  $\delta$ : 0.84-0.88 (3H, t,  $J = 6,8$  Hz), 1.27-1.35 (24H, tt,  $J = 7.0$  Hz), 1.53-1.60 (2H, tt,  $J = 7.2$  Hz), 1.66-1.73 (4H, tt,  $J = 7.0$  Hz), 3.35 (6 H, t,  $J = 7$  Hz), 3.44-3.51 (4H, t,  $J = 6.8$  Hz), 3.63-3.66 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta$  14.1 (1C, s), 22.6 (1C, s), 22.8 (2C, s), 25.7 (1C, s), 26.2 (2C, s), 29.2 (7C, s), 31.7 (1C, s), 32.7 (1C, s), 51.3 (2C, s), 62.8 (1C, s), 63.1 (2C, s); Masa molowa: 408,50 g/mol

#### 2.4.2 Produkcja membran nieporowatych z octanu celulozy

Do produkcji membran z octanu celulozy wybrano metodę "solvent casting method". Pierwszym krokiem było rozpuszczenie 0,25 g octanu celulozy w 15 mL acetonu. Starannie przeprowadzone mieszanie składników trwało przez jedną godzinę pod przykryciem, z zastosowaniem mieszadła magnetycznego przy 500 obr./min, mając na celu uzyskanie jednorodnego roztworu.

Następnie, homogeniczny roztwór został ostrożnie wylany na powierzchnię szalki Petriego, i poddany procesowi suszenia w temperaturze pokojowej. Okres suszenia trwał 24 godziny i odbywał się pod przykryciem, z niewielkimi otworami, celem umożliwienia kontrolowanego odparowania rozpuszczalnika.

Uzyskane membrany z octanu celulozy, po zakończonym procesie produkcji, były gotowe do dalszej obróbki oraz wykorzystania w kontekście planowanych eksperymentów i analiz.

### 2.4.3 Produkcja membran nieporowatych ze skrobi i chitozanu

Proces przygotowywania blendu skrobiowo-chitozanowego rozpoczyna się od utworzenia roztworu chitozanu poprzez rozpuszczenie 1 g chitozanu w 100 mL 2% (mas./obj.) roztworu kwasu octowego. Roztwór następnie należy mieszać aż do uzyskania jednorodnego roztworu. Równocześnie, w oddzielnej zlewce, 1 g skrobi ziemniaczanej miesza się z 100 mL wody destylowanej, a następnie podgrzewa do temperatury 90°C przy ciągłym mieszaniu. Po osiągnięciu tej temperatury podgrzewanie trwa przez 10 minut, a następnie roztwór schładzany jest do temperatury pokojowej.

Kolejnym etapem jest połączenie obu faz: roztworu chitozanu i roztworu skrobiowego. W trakcie tego procesu dodawana jest gliceryna w ilości 25% (w/w) względem substancji stałych obecnych w roztworze. Gliceryna pełni funkcję plastyfikatora poprawiającego elastyczność i przetwarzalność blendu. Cała mieszanina jest ponownie dokładnie mieszana, aby zapewnić jednolitą konsystencję. Po połączeniu faz i dodaniu gliceryny, roztwór poddawany jest procesowi odpowietrzania w łaźni ultradźwiękowej, co pomaga usunąć ewentualne pęcherzyki powietrza i zapewnia homogeniczność materiału.

Uzyskany blend zostaje następnie ostrożnie wylany do formy z polipropylenu o wymiarach 20,5 × 12 cm oraz mniejszą o wymiarach 14,1 × 6,3 cm. Ostrożność wylewania blendu do formy wynika z chęci uniknięcia ponownego napowietrzenia mieszaniny. Do większej formy wylano 125 mL mieszaniny zaś do mniejszej 45 mL. W konsekwencji objętość wylanego blendu na jednostkę powierzchni wynosiła 0,51 mL/cm<sup>2</sup>. Po wylaniu upewniono się, że na powierzchni nie ma pęcherzyków powietrza. Ewentualne pęcherze usuwano mechanicznie poprzez nakłucie metalową szpatułką. Formy z blendem umieszczono w suszarce rozgrzanej do 70°C, gdzie zawartość była suszona przez 24 godziny. Parametry suszenia oraz proporcje fazy chitozanowej, oraz skrobiowej były dobrane na podstawie wstępnych eksperymentów, których celem było uzyskanie filmów, które będą elastyczne oraz możliwe będzie łatwe oddzielenie ich od formy polipropylenowej.

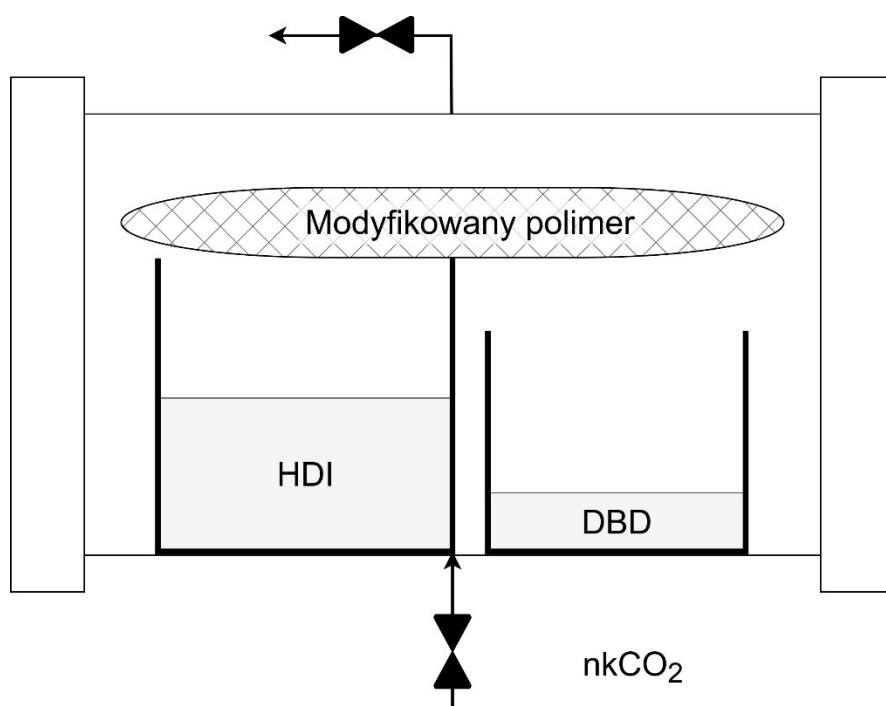
### 2.4.4 Procedura szczepienia nadkrytycznego

Procedura szczepienia w fazie nadkrytycznej była zainspirowana procedurą opracowaną przez Xu i in. [101]. Badacze przedstawili metodę otrzymywania zmodyfikowanego drewna świerkowego przy pomocy szczepienia nadkrytycznego. Zsyntezowane czwartorzędowe związki amoniowe zgodnie z procedurą Yagci i in. [103] przyłączono w dwuetapowej reakcji do grup hydroksylowych drewna poprzez łącznik diizocyjanian heksametylenu. W obu etapach reakcja zachodziła w 100°C i 41,4 MPa przez 20 godzin. W pierwszym etapie przereagowano grupy hydroksylowe drewna łącznikiem diizocyjanianowym, natomiast w drugim etapie przyłączono czwartorzędowe związki amoniowe do łącznika poprzez wiązanie uretanowo-karbaminianowe.

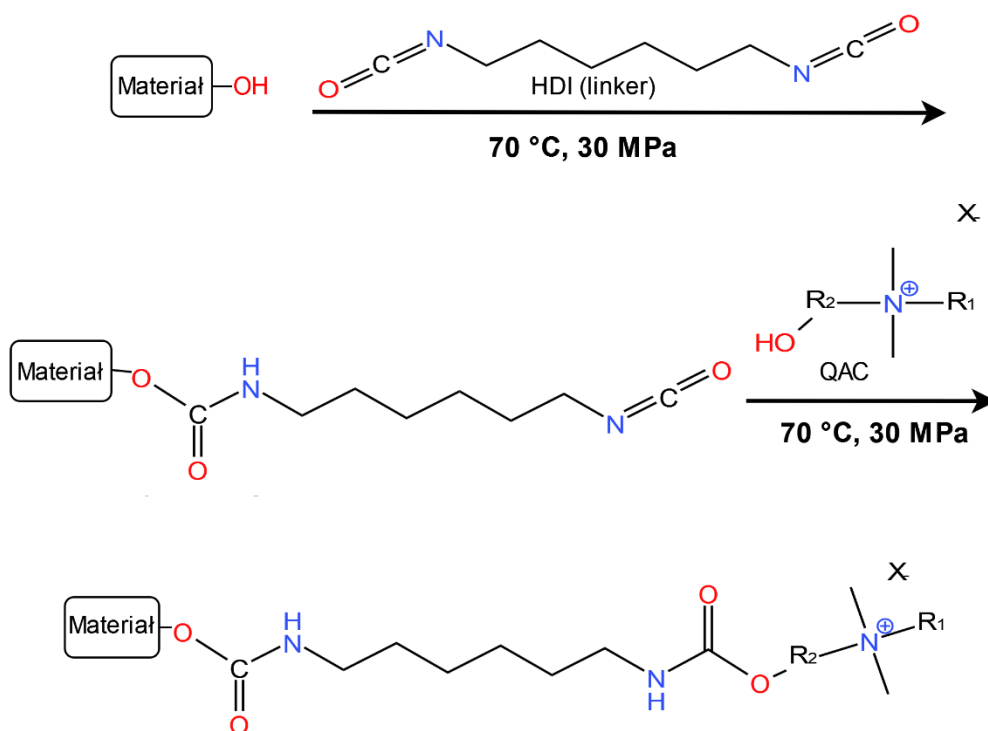
Zaadaptowaną procedurę szczepienia nadkrytycznego dla części eksperymentalnej pracy doktorskiej opisano w następujący sposób. Do naczynia wysokociśnieniowego o objętości 25 mL umieszczono osobno



w szklanych naczyniach 1,4 mL diizocyjanianu heksametylenu (HDI) oraz 0,2 mL dilaurynianu dibutylocyny (DBD). DBD był stosowany jako katalizator reakcji. Nad szklanym naczyniem z substancją aktywną umieszczono materiał przeznaczony do modyfikacji. Sposób ułożenia reagentów i modyfikowanego polimeru przedstawiono na Rysunku 2.9. W pracy modyfikowano octan celulozy w postaci granulek i wytworzonych filmów lub filmy z blendów ze skrobi i chitozanu. Każdorazowo 0,6 g polimeru było zabezpieczane poprzez umieszczenie w filtrze papierowym w celu ochrony przed ochlapaniem substancją aktywną. Filtr papierowy był dodatkowo zabezpieczony przed otwarciem metalową siatką. W pracy starano się używać jak najmniejszej ilości filtru papierowego, mając na uwadze, że on sam podlegał modyfikacji z racji obecności grup hydroksylowych.



Rysunek 2. 9 Umieszczenie reagentów i polimerów zabezpieczonych filtrem papierowym w reaktorze wysokociśnieniowym o pojemności 25 mL.



Rysunek 2. 10 Schemat dwustopniowej nadkrytycznej reakcji szczepienia materiału z grupami hydroksylowymi

Następnie umieszczono polimer i reagenty w reaktorze wysokociśnieniowym o pojemności 25 mL, który zamknięto szczelnie. Wpuszczono CO<sub>2</sub> aż do wyrównania ciśnienia z ciśnieniem w butli CO<sub>2</sub>. Reaktor termostatowano do osiągnięcia temperatury roboczej równej 70°C. Po osiągnięciu temperatury roboczej zwiększono ciśnienie przy pomocy kompresora wysokociśnieniowego do uzyskania ciśnienia roboczego wynoszącego 300 bar. W pracy badano potrzebny minimalny czas reakcji potrzebny na przereagowanie hydroksylowych grup funkcyjnych octanu celulozy lub skrobi i chitozanu. Dla octanu celulozy zbadano czasy 4, 6 i 20 godzin. Dla blendów polimerowych zbadano zakresy 2-6 godzin. Uzyskane próbki wyczyszczono ręcznikiem papierowym oraz przemyto trzykrotnie etanolem w celu usunięcia nieprzereagowanego HDI z powierzchni materiału.

W drugim etapie modyfikowana próbka z przyłączoną grupą diizocyjanianową zabezpieczona przy pomocy filtru papierowego była umieszczona obok 0,6 g jednego z czwartorzędowych związków amoniowych (QAC). Ułożenie reagentów wykonano analogicznie do przedstawionego na Rysunku 2.9. W tym przypadku zaszczipiony polimer ułożono na naczyniu z QAC. Po zamknięciu reaktora wpuszczono do wnętrza CO<sub>2</sub> aż do wyrównania ciśnienia z ciśnieniem butli CO<sub>2</sub>. Reaktor termostatowano do osiągnięcia temperatury roboczej 70°C. Uzyskawszy temperaturę procesu, zwiększono ciśnienie do wartości roboczej 30 MPa. W pracy badano 4, 6 i 20 godzin reakcji dla szczepienia QAC do octanu celulozy oraz zakres 2-6 godzin dla blendów polimerowych.

Schemat reakcji obu etapów przedstawiono na Rysunku 2.10.

Uzyskane próbki przemyto trzykrotnie etanolem oraz oczyszczono ręcznikiem papierowym w celu usunięcia QAC z powierzchni materiału.

Zmianę masy po każdym z etapów mierzono przy pomocy wagi analitycznej zaś wydajność szczepienia (Y) ze wzoru:

$$Y = \frac{W - W_0}{W_0} \cdot 100\% \quad (2.3)$$

Gdzie W to masa zmodyfikowanego polimeru,  $W_0$  to masa polimeru przed modyfikacją. W trakcie pracy wykorzystywano wagę analityczną posiadającą certyfikowaną dokładność do 0,0001 g.

## 2.4.5 Badania mikrobiologiczne

### 2.4.5.1 Badanie właściwości antybiofilmowych

Badania zostały przeprowadzone na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu z użyciem szczepów bakterii: *Bacillus (B.) cereus* ATCC 11778, odporne na metycylinę *Staphylococcus (S.) aureus*, (MRSA) ATCC43300, *S. aureus* ATCC 29213, *Listeria (L.) monocytogenes* ATCC 13932, *E. coli* ATCC 10536, *Salmonella (S.) Enteritidis (Salmonella enterica subspecies entericaserovar Enteritidis)* ATCC 13076 (Microbiologics, St.Cloud, MN, USA).

W pierwszej kolejności wszystkie szczepy zostały przebadane pod kątem zdolności produkcji biofilmu i bazując na uzyskanych badaniach wstępnych, zostały one skategoryzowane jako szczepy o silnej zdolności do tworzenia biofilmu z wyjątkiem szczepu *L. monocytogenes* ATCC 13932, który został zakwalifikowany jako szczep o umiarkowanej zdolności do tworzenia biofilmu.

Wybór szczepów był podyktowany ich znaczeniowości dla wyzwań współczesnej medycyny, jak i również przemysłu spożywczego i wodnego. W pracy wykorzystano wcześniejsze testy opisujące adhezję mikrobów do polimerów [14], [100].

Zmodyfikowano je do wykorzystania płytek do mikromiareczkowania z 96 płaskodennymi dołkami (neoCulture Cell and Tissue Culture Plates W96, nr C-8206, neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Niemcy). Przed badaniem szczepy hodowano przez 24 godziny w bulionie Mueller Hinton z dodatkiem kationów (CAMHB, Becton Dickinson, Heidelberg, Niemcy) z dodatkiem 1% glukozy (Merck, KGaA, Darmstadt, Niemcy) w celu stymulacji produkcji egzopolisacharydów ważnych dla organizmu do adhezji i wytwarzania biofilmu [14].

Polimerowe kulki z octanu celulozy sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121 °C i ciśnieniu 120 kPa. Dołki płytek do mikromiareczkowania napełniono 100 µL bulionu Tryptone Soya Broth (CM0129, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Wielka Brytania) i umieszczono w nich kulki polimerowe każdego rodzaju (CA, CA-HDI-QAC 1, CA-HDI-QAC 2). Każda kulka polimeru miała pole powierzchni

około 18 mm<sup>2</sup>, toteż kulki pogrupowano w grupy po 3 (tj. jedna próbka składała się z 3 kulek) w celu zwiększenia pola powierzchni umożliwiającego ewentualną adhezję.

Przygotowano początkowe inokulum bakteryjne o stężeniu 1–2·10<sup>8</sup> CFU/mL (OD600 0,08–0,1, Spectrofotometer Genesys 10-S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), rozcieńczono do 1–2·10<sup>6</sup> CFU/mL, i do badanych dołków zaszczepiono 10 µL tejże zawiesiny (końcowa inkulum 1–2·10<sup>5</sup> CFU/mL). Inkubację prowadzono w temperaturze 37 °C przez 24 godziny. Następnie kulki polimerowe usunięto aseptycznie, dokładnie przemyto sterylnym roztworem Ringera (112 mM NaCl, Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy; 6 mM KCl, Chempur, Piekary Śląskie, Polska; 2 mM CaCl<sub>2</sub>, Eurochem BGD, Tarnów, Polska; 1 M NaHCO<sub>3</sub> Eurochem BGD, Tarnów, Polska) w celu usunięcia komórek planktonowych z powierzchni, a następnie umieszczono w sterylnych 50 mL probówkach typu eppendorf (Eppendorf Tubes® BioBased) z zakrętkami, z 10 mL roztworu Ringera i poddano działaniu ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej (37 000 Hz, Elmasonic S60, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Niemcy) przez 5 sekund/minutę, przez całkowity czas 5 min. Po zakończeniu sonikacji probówkę, w której przeprowadzono sonikację, uznano za rozcieńczoną w stopniu 10<sup>-1</sup>. Z tego roztworu wykonano dalsze rozcieńczenia od 10<sup>-2</sup> do 10<sup>-7</sup>. Z każdego rozcieńczenia zaszczepiono 100 µL odpowiedniej pożywki w trzech powtórzeniach: *L.monocytogenes* na 5% agarze z krwią baranią (Becton Dickinson, Heidelberg, Niemcy), *E.coli* i *Salmonella spp.*, na agarze MacConkeya (Becton Dickinson, Niemcy), Heidelberg, Niemcy), *B. cereus*, *MRSA* i *S.aureus* na agarze sojowym Trypton (Tryptone Soya Broth, CM0129, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Wielka Brytania, 1,2% Agar Bakteriologiczny (Agar nr 1, LP0011, Oxoid Ltd.), Basingstoke, Hampshire, Wielka Brytania). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 48–72 godzin. Całe doświadczenie powtórzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Protokół zliczania i przeliczania całkowitej liczby CFU/mL przeprowadzono zgodnie z normę ISO 7218 [134].

Stosowano wyłącznie płytki, na których wyrosło co najmniej 15 i co najwyżej 300 kolonii. Przeliczenie liczby CFU/mL otrzymanej w rozcieńczeniach na całkowitą liczbę CFU/mm<sup>2</sup> polimeru, od którego oddzielono bakterie od polimeru metodą ultradźwięków, wykonano ze wzoru:

$$NP = \frac{NCFU \cdot V}{P} \quad (2.4)$$

Gdzie: NCFU oznacza całkowitą liczbę oddzielonych bakterii od polimeru (wcześniej opisywane jako CFU/mL), V to objętość roztworu Ringera w probówkach, w których przeprowadzono oddzielanie bakterii przy pomocy ultradźwięków, P oznacza całkowitą powierzchnię polimeru wyrażoną w mm<sup>2</sup>.

#### 2.4.5.2 Badanie działania antybakteryjnego polimerów w hodowli bulionowej (wpływ na namnażanie i redukcję ogólnej liczby bakterii)

W tej części badania zastosowano wszystkie materiały i procedury opisane w Rozdziale 2.4.5.1. Po inkubacji płytek mikrotitracyjnych z polimerami i badanymi szczepami, kulki polimeru usunięto,

a pozostałe hodowle bulionowe rozcieńczono seryjnie od  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$ . Zaszczepianie i obliczanie całkowitej liczby bakterii (CFU/mL) przeprowadzono w sposób opisany w rozdziale 2.4.5.1.

### 2.4.5.3 Utrwalanie próbek do testów mikroskopowych SEM

Utrwalanie szczepów bakterii przyłączonych do powierzchni polimeru poddanego obróbce w bulionie sojowym Tryptone zostało przeprowadzone zgodnie z wcześniej opisaną procedurą [135]. Polimery trzymano przez 30 minut w 2,5 molowym aldehydzie glutarowym (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Szwajcaria), który uprzednio rozpuszczono w 0,5 M buforze kakodylanu sodu (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy), a następnie zanurzono na 15 minut w roztworze etanol-woda w kolejnych stężeniach (tj. objętościowo: 30/70, 50/50, 70/30, 90/10, 100, Avantor Performance Materials Poland S.A. (dawniej POCH S.A.), Gliwice, Polska), a na koniec przez 30 sekund w Heksametylodisilazanie (99%) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy).

## 2.5 Charakteryzacja

W niniejszym rozdziale zostaną omówione wykorzystane metody charakteryzacji materiałów.

Potwierdzenie obecności substancji aktywnej na powierzchni materiału uzyskano za pomocą spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR, *ang.* *Fourier-transform infrared*). Widma FTIR dla membran zaimpregnowanych oraz niezmodyfikowanych zostały zarejestrowane przy użyciu spektrometru Nicolet iS50 (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) w trybie pracy ATR o rozdzielczości  $4\text{ cm}^{-1}$  i zakresie fal  $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ . Porównanie obu (przed i po modyfikacji) widm oraz analiza ich różnic umożliwia identyfikację nowych, charakterystycznych pików wskazujących na obecność substancji aktywnej.

Aby ocenić hydrofilność zmodyfikowanego i niezmodyfikowanego filmu polimerowego, posłużono się goniometrem model OCA 15EC (DataPhysics, Filderstadt, Niemcy) do pomiaru kąta zwilżania wodą. Dozowanie kropli wody o objętości do 30 pikolitrow było możliwe dzięki systemowi dozowania pikolitrow firmy DataPhysics (PDDS). Obserwacja kropli wody odbywała się za pomocą kamery, a kąt zwilżania został zmierzony w momencie kontaktu oraz po 3, 6, 9 i 12 sekundach od kontaktu. Wykonanie zdjęć i pomiar kąta zwilżania było możliwe dzięki oprogramowaniu SCA20 dostarczonemu przez producenta goniometru.

Badania właściwości strukturalnych materiałów przeprowadzono przy użyciu mikroskopu dwuwiązkowego SEM/Ga-FIB FEI Helios NanoLab TM 600i, wyprodukowanego przez FEI (Thermo Fisher Scientific, Eindhoven, Holandia). Użyty mikroskop łączy w sobie możliwości mikroskopii elektronowej i jonowej o ultrawysokiej rozdzielczości. Skupiona wiązka jonów galu ułatwiała precyzyjne

usuwanie materiału z próbek, pozwalając na tworzenie przekrojów poprzecznych membran. Przed analizą próbki poddano procesowi powlekania złotem.

Do określenia rozkładu wielkości porów membran zastosowano Coulter® Porometer II, od firmy Coulter Electronics Ltd. (Luton Bedfordshire, UK), wyposażony w Porofil jako ciecz zwilżającą.

Potencjał Zeta powierzchni membran określono za pomocą analizatora potencjału zeta firmy Anton Paar (Graz, Austria) model SurPASS 3. Analizę przeprowadzono w 1 mM roztworze KCl o pH 6,3 w temperaturze 25°C. Każda membrana została poddana pięciokrotnemu procesowi pomiaru w celu zapewnienia dokładności i powtarzalności.

Właściwości mechaniczne zmodyfikowanych i niezmodyfikowanych kulek z octanu celulozy były badane za pomocą pomiaru siły ściskania, która spowodowała deformację kulek. Do tego celu użyto przyrządu IMADA Force Gauge ze stojakiem MX2-500N (IMADA. CO. LTD, Japonia). Dla każdego rodzaju próbki przeprowadzono pięć pomiarów, a wyniki siły zostały przedstawione jako średnia wartość wraz z odchyleniem standardowym.

Przeprowadzono analizę różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) w różnicowym kalorymetrze skaningowym (Q10, TA Instruments, New Castle, DE, USA). Metoda była oparta na metodzie Milanovic i in. [136], której źródło jest w pracy Obradovic i in. [137]. Próbka była podgrzana z szybkością 10°C/min od temperatury pokojowej 25°C do 300°C w atmosferze azotu z przepływem azotu o wartości 50 mL/min, aby uniknąć reakcji utleniania. Próbki (o masie początkowej 10 mg) były umieszczone w hermetycznie zamkniętej aluminiowej tacy i poddawane trzem pomiarom. Metodą DSC uzyskano temperaturę desorpcji ( $T_d$ ), temperaturę zeszklenia ( $T_g$ ) oraz temperaturę topnienia ( $T_m$ ). Stopień krystaliczności obliczono jako stosunek entalpii topnienia badanego materiału ( $\Delta H_m$ ) do odpowiedniej wartości dla całkowicie krystalicznego materiału octanu celulozy ( $\Delta H_m^\circ$ ) za pomocą wzoru:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^\circ} \cdot 100\% \quad (2.5)$$

gdzie  $\Delta H_m^\circ$  jest równy 58,8 J/g, zgodnie z propozycją Cerqueiry i in. [138] oraz Sousa i in. [139].

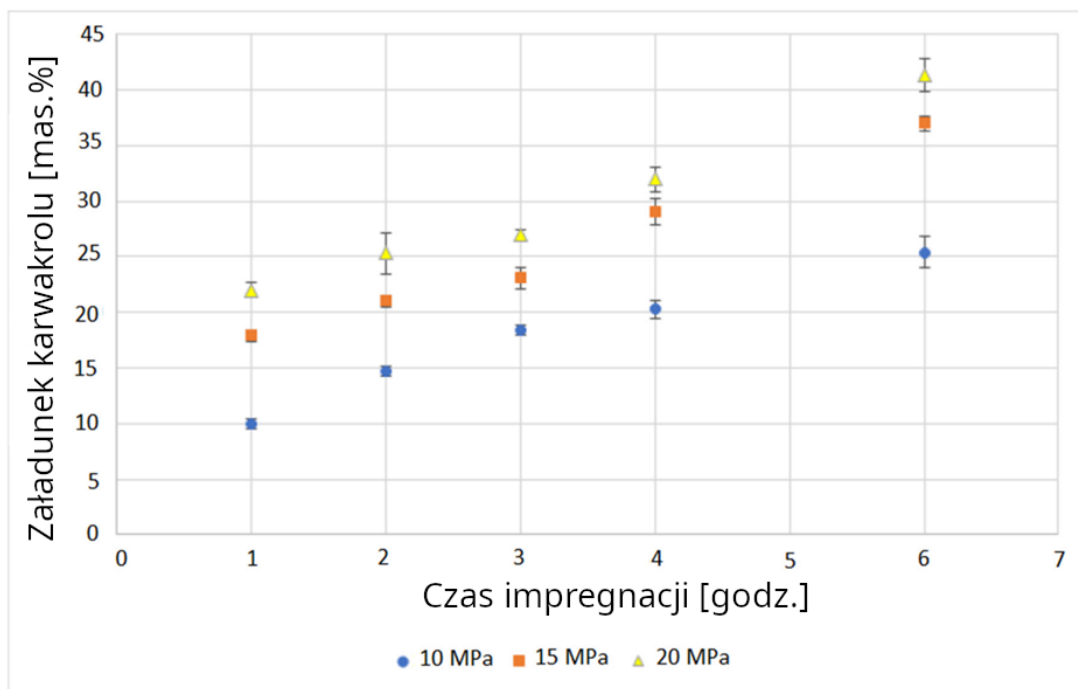
Widma spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego 1D (1H, 13C,) zarejestrowano stosując NMR Bruker Avance 600 MHz z magnesem UltraShield Plus (Billerica, Massachusetts, USA). Próbki przygotowano w następujący sposób: 20 mg substancji rozpuszczono w 700  $\mu$ L rozpuszczalnika ( $CDCl_3$ ). Przesunięcia chemiczne 1H i 13C odniesiono do tetrametylosilanu (TMS; 0,0 ppm).

### 3 Rezultaty i wnioski

Wyniki przedstawione w poniższym rozdziale dotyczą procesów impregnacji nadkrytycznej karwakrolem octanu celulozy oraz poliamidu, oraz szczepienia nadkrytycznego octanu celulozy, oraz blendów skrobiowo-chitozanowych. Rozdział 3.1 dotyczy wyników impregnacji nadkrytycznej membran poliamidowych (Rozdział 3.1.1) oraz z octanu celulozy (Rozdział 3.1.2). W rozdziałach tych przedstawiono charakterystykę otrzymanych materiałów, wpływ załadunku karwakrolu na strukturę modyfikowanej membrany oraz opisują dalszą ich aplikację. Rozdział 3.1.3 przedstawia wnioski dotyczące wyników odnoszących się do impregnacji nadkrytycznej. Wyniki dotyczące impregnacji nadkrytycznej zostały opublikowane w dwóch artykułach [140], [141]. Rozdział 3.2 opisuje wyniki związane z eksperymentami szczepienia nadkrytycznego membran z octanu celulozy oraz z blendów skrobiowo-chitozanowych. W rozdziale tym zawarto wyniki syntezy czwartorzędowych związków amoniowych (Rozdział 3.2.1) oraz ich dalsze szczepienie (Rozdział 3.2.2) do octanu celulozy (Rozdział 3.2.3) i blendów skrobiowo-chitozanowych (Rozdział 3.2.4). W Rozdziale 3.2.3.2 opisano wyniki analizy mikrobiologicznej, w której zbadano potencjalne właściwości antybiofilmowe, jak i potencjalne właściwości antybakteryjne zaszczipionego octanu celulozy. W Rozdziale 3.2.5 przedstawiono wnioski dotyczące wyników odnoszących się do szczepienia nadkrytycznego. Wyniki dotyczące szczepienia nadkrytycznego octany celulozy zostały opublikowane [135].

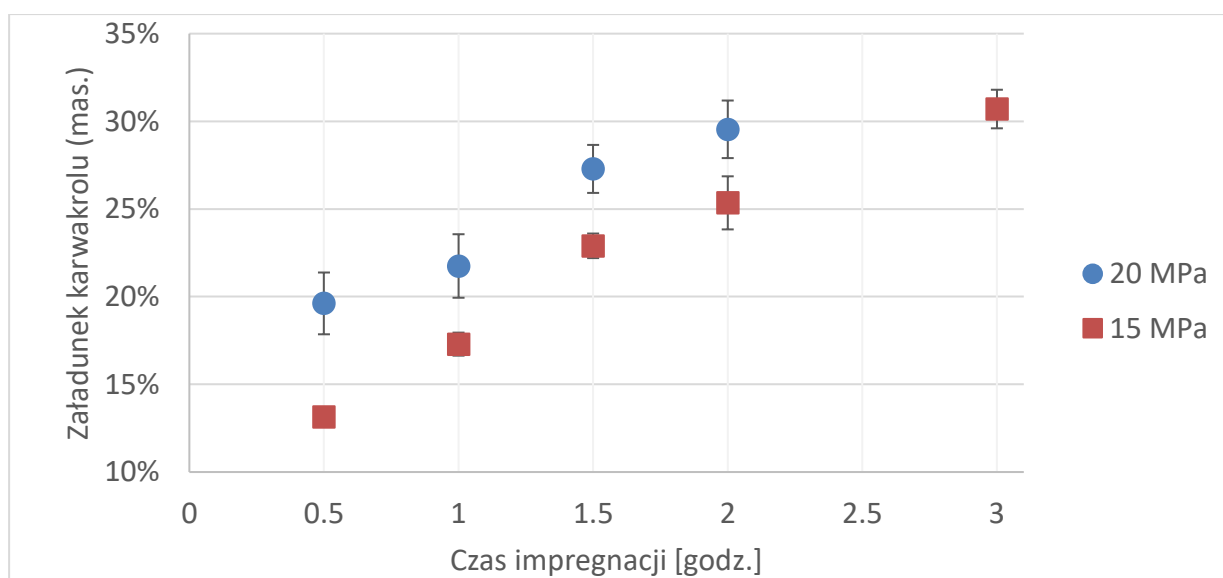
#### 3.1 Impregnacja nadkrytyczna membran z poliamidu i octanu celulozy

Eksperymenty impregnacji nadkrytycznej (SSI) membran poliamidowych karwakrolem przeprowadzono w następujących warunkach procesowych: temperatura 40°C, ciśnienie: 10, 15 i 20 MPa, czas impregnacji: 1, 2, 3, 4 i 6 godzin. Każdy wariant eksperymentu przeprowadzono co najmniej trzykrotnie i za każdym razem impregnowano cztery membrany. Wydajność impregnacji (załadowanie) oraz odchylenie standardowe wyliczono w sposób przedstawiony w rozdziale 2.3.1. Wyniki [141] zaprezentowane na Rysunku 3.1 wykazują szybki załadunek karwakrolem przy wykorzystaniu ciśnień 15 i 20 MPa. Już po jednej godzinie uzyskano kolejno 17,9% i 22%. Po sześciu godzinach SSI w naszym badaniu uzyskano średnie załadunki karwakrolu wynoszące 25,4%, 37,0% i 41,3% odpowiednio przy 10, 15 i 20 MPa. Maksymalnie możliwe załadowanie wyniosło 54% przy dłuższym czasie i 20 MPa, jednakże efekt pęcznienia uszkodził membranę.



Rysunek 3. 1 Kinetyka impregnacji membran poliamidowych karwakrolem przy 40°C wraz z odchyleniem standardowym.

Eksperymenty SSI membran z octanu celulozy karwakrolem [140] przeprowadzono w następujących warunkach procesowych: temperatura 40°C, ciśnienie: 15 i 20 MPa, czas impregnacji: 0,5, 1, 1,5, 2 i 3 godziny. Podobne jak w przypadku membran poliamidowych, każdy wariant eksperymentu przeprowadzono co najmniej trzykrotnie i za każdym razem impregnowano cztery membrany. Wydajność impregnacji (załadowanie) oraz odchylenie standardowe wyliczono w sposób przedstawiony w rozdziale 2.3.1.



Rysunek 3. 2 Kinetyka impregnacji membran z octanu celulozy karwakrolem przy 40°C wraz z odchyleniem standardowym



Załadunek karwakrolu do membrany z octanu celulozy uzyskany w eksperymencie SSI przedstawiono na Rysunku 3.2. Załadowanie karwakrolu po 30 minutach wynosiło odpowiednio 19,6% i 13,2% dla 20 MPa i 15 MPa. W próbkach zawierających powyżej 30% wag. karwakrolu zaobserwowano niewielkie zmarszczki membrany wskazujące na zjawisko pęcznienia. W związku z tym nie zdecydowano się na dłuższą impregnację membran z octanu celulozy.

Metoda SSI została wykorzystana przez zespół Milanovic i in. do impregnacji octanu celulozy przy pomocy karwakrolu [81]. Eksperymenty prowadzono w 50°C, badając ciśnienia 10, 21 i 30 MPa oraz badając przedział czasowy impregnacji 2-18 godzin. W czasie 2 godzin impregnacji dla ciśnień 10, 21 i 30 MPa uzyskano kolejno 6,0%, 19,7% i 36,7%. W zaprezentowanych wynikach na Rysunku 3.2 po 2 godzinach przy ciśnieniu 20 MPa uzyskano załadunek około 30%. W przytoczonym badaniu [81] stwierdzono, że próbka octanu celulozy zaimpregnowana w 30% karwakrolem nadal zachowywała strukturę porowatą o submikronowej średnicy porów polimeru pierwotnego. W innej pracy [142] w warunkach nadkrytycznych 50°C i 21 MPa przeprowadzono impregnację octanu celulozy karwakrolem uzyskując 2,5% po 30 minutach i 31,4% po 2 godzinach impregnacji.

W pracy Zizovic i in. zaimpregnowano poliamidowe membrany do mikrofiltracji wysokimi załadunkami tymolu [143]. Wykazano w niej załadunek dochodzący do 43% i szybką impregnację w pierwszej godzinie procesu. Już po 30 minutach SSI uzyskano załadunek wynoszący 20, 27,5 i 29% mas. odpowiednio przy 10, 15 i 20 MPa. Po godzinie zaś otrzymali około 26, 30 i 35% odpowiednio przy 10, 15 i 20 MPa. Zaprezentowane wyniki na Rysunku 3.1 wykazują załadunek karwakrolu do poliamidowych membran do mikrofiltracji na poziomie 10, 17,9% i 22% odpowiednio przy 10, 15 i 20 MPa.

Zespół Milanovic i in. zaimpregnował bawełnianą gazę karwakrolem [77] i – jego izomerem – tymolem [78]. W przypadku impregnacji karwakrolem, osiągnięcie 14,4% załadunku wymagało wysokiego ciśnienia i temperatury, kolejno 30 MPa oraz 50°C jak i długiego czasu impregnacji, tj. 24 godzin. Załadunek tymolem następował natomiast szybciej, gdyż po 2 godzinach i przy niższej temperaturze i ciśnieniu, kolejno 35°C i 15,5 MPa uzyskano 11% mas. Tymol został również wykorzystany w impregnacji poliamidowych nanowłókien. Badania [144] wskazały szybko następującą impregnację w pierwszych 30 minutach procesu, co jest zgodne z obserwacją wykazaną na Rysunku 3.1 i 3.2. Przy ciśnieniach 7, 10 i 20 MPa uzyskano załadunek tymolu kolejno 6,5%, 23% i 32%.

Impregnacja obu materiałów wykazuje zależność, że większe ciśnienie przekłada się na szybszą impregnację. W trakcie impregnacji octanu celulozy, przy ciśnieniu 20 MPa osiągnięcie załadunku około 30% karwakrolu zajęło dwie godziny. Jednak przy ciśnieniu 15 MPa osiągnięcie tego samego załadowania wymagało trzech godzin. Impregnacja poliamidu wykazała, że osiągnięcie załadunku 25% przy 10 MPa wymaga 6 godzin, natomiast przy 20 MPa wymagane są tylko 2 godziny. Wskazuje to na dominujący wpływ rozpuszczalności karwakrolu w  $\text{nkCO}_2$  podczas procesu. Ułamek molowy karwakrolu w  $\text{nkCO}_2$

wzrósł z 0,014 do 0,034 i 0,051, gdy ciśnienie wzrosło do kolejno: 10 do 15 i 20 MPa [145]. Umożliwiło to w ten sposób szybszą impregnację przy wyższych ciśnieniach.

Warto przypomnieć, że karwakrol był obecny podczas w nadmiarze, co umożliwiło nasycenie fazy nadkrytycznej karwakrolem w trakcie trwania impregnacji. Mechanizm ten niezbędny do uzyskania wysokiego załadunku karwakrolu do membrany został opisany przez Rojas i in. [146] Otóż obecność substancji aktywnej w nadmiarze sprawia, iż wzrost ciśnienia (lub gęstości) ditlenku węgla prowadzi do wzrostu stężenia rozpuszczonej substancji aktywnej w fazie nadkrytycznej. W przypadku prowadzenia impregnacji z nienasyconą fazą nadkrytyczną tj. substancja aktywna nie jest w nadmiarze, wzrost ciśnienia ditlenku węgla będzie prowadzić do rozcieńczenia substancji aktywnej. Powodem tego jest stała masa substancji aktywnej pozostającej w układzie. W związku z tym niższy gradient stężenia substancji aktywnej pomiędzy fazą nadkrytyczną a impregnowanym materiałem będzie skutkować niższym załadunkiem substancji aktywnej do struktury materiału. Kolejne zjawisko wpływające na impregnację to pęcznienie polimeru pod wpływem  $\text{nkCO}_2$ . Zjawisko to wpływa na przyspieszenie impregnacji karwakrolem. Pęcznienie jest proporcjonalne do ilości zaabsorbowanego ditlenku węgla ( $\text{CO}_2$ ) [147], a w przypadku wielu badanych polimerów półkryształicznych ciśnienie ma dodatni wpływ na to zjawisko [148].

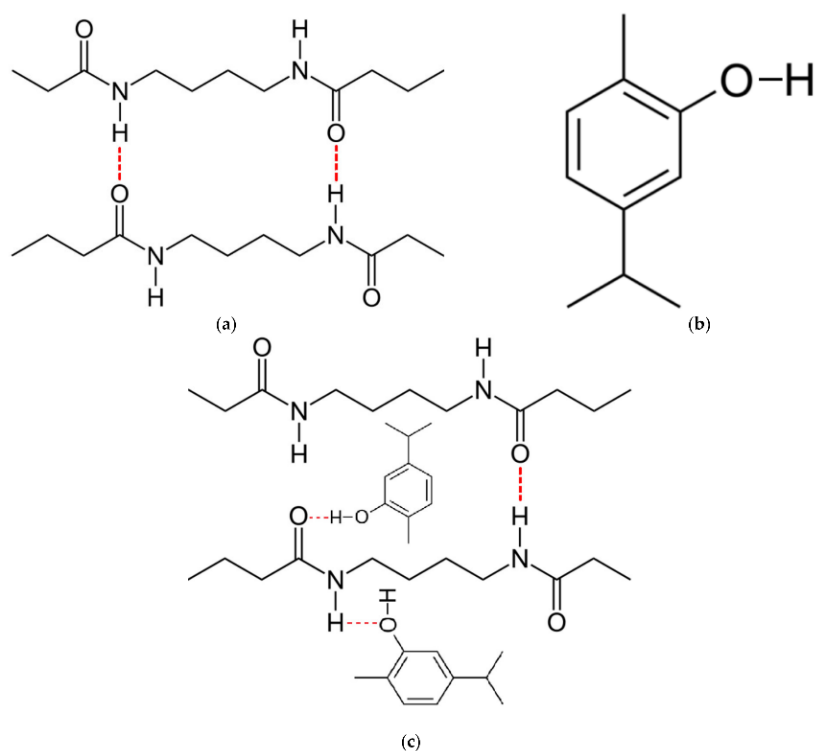
Można zatem stwierdzić, że efekt sorpcji i pęcznienia przyczynił się również do szybszej impregnacji przy wyższych ciśnieniach. Badania Zizovic i in. z wykorzystaniem SEM i mikroskopii jonowej [143] wykazały, że pęcznienie poliamidu spowodowane ekspozycją na czysty  $\text{nkCO}_2$  (bez impregnacji) było tymczasowe. Polimer taki powraca do ostatniego stanu po ekspozycji, zachowując strukturę polimeru pierwotnego. Również w ten sam sposób zachowywała się membrana po ekspozycji na  $\text{nkCO}_2$  w teście filtracji w przepływie krzyżowym [143]. W załączniku na Rysunku Z.1 przedstawiono widmo FTIR niezmodyfikowanej membrany poliamidowej poddanej działaniu  $\text{nkCO}_2$ , w której nie zaobserwowano żadnych różnic.

Warto wyjaśnić pewne czynniki w eksperymentach SSI, które mogą mieć wpływ na dokładność pomiaru. Po pierwsze, SSI to proces, w którym zachodzi dwukierunkowy proces transportu masy. Obejmuje on impregnację polimeru, lecz także usuwanie ekstrahowalnych związków z polimeru. Drugi czynnik to czas potrzebny na desorpcję  $\text{CO}_2$ . Ustalono, że frakcja substancji ekstrahowalnych z membran wynosi około 0,3% wag. Oznaczałoby to, że wartości załadunku karwakrolu zostały zaniżone o tę samą wartość. Zaobserwowano, że desorpcja  $\text{CO}_2$  z membran była procesem powolnym i do całkowitej desorpcji potrzeba kilku dni. Pomiar próbek pół godziny po dekompresji doprowadził do przeszacowania zmierzonej wartości o około 0,44% wag. Ostatecznie otrzymane wartości zostały zawyżone o około 0,14%, co nie jest błędem istotnym dla dużych ładunków i mieści się w granicy błędu eksperymentalnego.

Uzyskanie wysokich załadunków karwakrolu do struktury membrany poliamidowej i membrany z octanu celulozy jest możliwe dzięki powstającym wiązaniom wodorowym między strukturą polimeru a substancją czynną – karwakrolem [144], [146]. Zjawisko to zostało zaobserwowane dla modyfikowanych w tej pracy

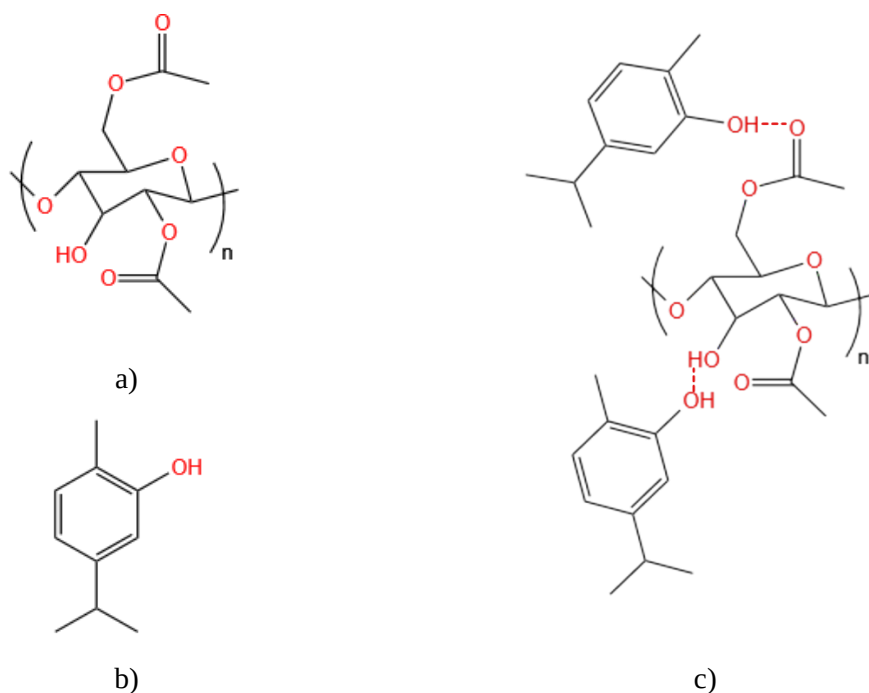
polimerów, czyli octanu celulozy [81], [149] i poliamidu [143]. Jednakże tworzenie tych wiązań prowadzi do osłabienia oddziaływań elektrostatycznych między łańcuchami polimerowymi impregnowanego materiału. Powoduje to trwałe pęcznienie polimeru z wysokimi ładunkami karwakrolu lub jego izomeru – tymolu.

Wzory strukturalne poliamidów (Rysunek 3.3a) i karwakrolu (rysunek 3.3b) wskazują na możliwość występowania wiązań wodorowych pomiędzy grupą karbonylową poliamidu i wodorem z grupy hydroksylowej karwakrolu oraz wodorem z grupy iminowej poliamidu i tlenem z grupy hydroksylowej karwakrolu (Rysunek 3.3c). Ponadto należy podkreślić, że w poliamidzie istnieje wiązanie wodorowe pomiędzy grupami karbonylową i iminową, co zaznaczono na czerwono na Rysunku 3.3a.



Rysunek 3. 3 Wzory strukturalne poliamidu z wiązaniami wodorowymi pomiędzy łańcuchami polimeru pokazano na czerwono (a) i karwakrolu (b); możliwe wiązania wodorowe w poliamidzie zaimpregnowanym karwakrolem (c).[141]

W przypadku impregnacji nadkrytycznej karwakrolem octanu celulozy dochodzi do powstania wiązań wodorowych między grupą hydroksylową karwakrolu a grupami funkcyjnymi octanu celulozy tj. grupami hydroksylowymi i karbonyłowymi. Wzory strukturalne octanu celulozy, karwakrolu i możliwych wiązań wodorowych między polimerem a substancją aktywną zostały zaprezentowane na Rysunku 3.4.

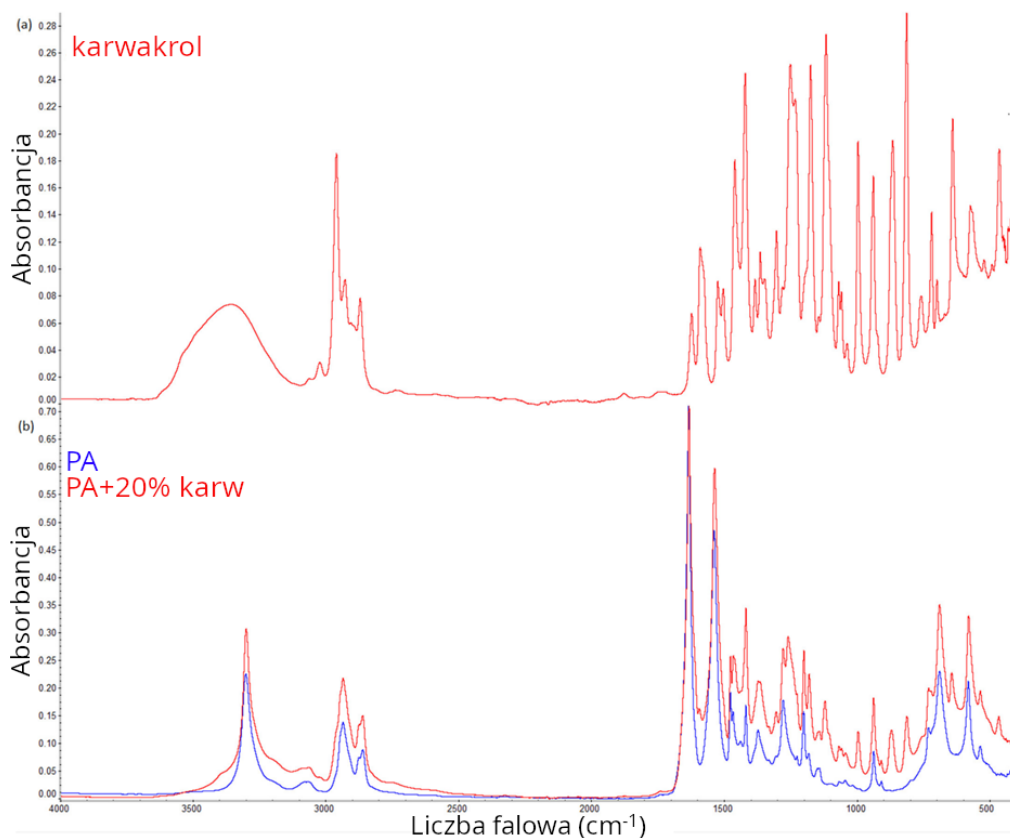


Rysunek 3. 4 Wzory strukturalne octanu celulozy (a) i karwakrolu (b); możliwe wiązania wodorowe w octanie celulozy zaimpregnowanym karwakrolem (c).

### 3.1.1 Charakterystyka i aplikacja membran poliamidowych

#### 3.1.1.1 Analiza FTIR

Widma FTIR karwakrolu, niezaimpregnowanej membrany poliamidowej oraz membrany poliamidowej z 20% zawartością karwakrolu przedstawiono na Rysunku 3.5. Długości fal charakterystycznych pasm podano w Tabeli 3.1. W widmie karwakrolu pasmo należące do drgań rozciągających –OH wykryto przy  $3378\text{ cm}^{-1}$ , natomiast pasma przypisane drganiom rozciągającym dla alifatycznych –CH<sub>2</sub> oraz –CH<sub>3</sub> zarejestrowano przy  $2958$ ,  $2926$  i  $2868\text{ cm}^{-1}$  [150], [151], [152]. Pasma  $811\text{ cm}^{-1}$  można przypisać do drgań pozapłaszczyznowych –C–H [151], [152]. Piki związane z substytucją orto i 1:2:4 karwakrolu były widoczne odpowiednio przy  $1115$  i  $994\text{ cm}^{-1}$  [150], [151], [152]. Wykryte kluczowe charakterystyczne piki karwakrolu [150], przedstawiono w Tabeli 3.1.



Rysunek 3. 5 Widma FTIR karwakrolu (a) oraz niezaimpregnowanej i zaimpregnowanej membrany poliamidowej (b)

Tabela 3. 1 Wykaz charakterystycznych pików w widmach FTIR: karwakrolu, poliamidu, zaimpregnowanego karwakiem poliamidu wraz z ich długościami falowymi

Przypisanie	Karwakrol	Poliamid	Poliamid+ Karwakrol	Źródło
C–H pozapłaszczyznowe drżania wachlarzowe	811 cm <sup>-1</sup>	-	810 cm <sup>-1</sup>	[150], [151], [152]
Charakterystyczny pik karwakrolu	864 cm <sup>-1</sup>	-	867 cm <sup>-1</sup>	[150]
Karwakrol 1:2:4 substytucja	994 cm <sup>-1</sup>	-	995 cm <sup>-1</sup>	[150], [151], [152]
Karwakrol orto substytucja	1115 cm <sup>-1</sup>	-	1118 cm <sup>-1</sup>	[150], [151], [152]

Przypisanie	Karwakrol	Poliamid	Poliamid+ Karwakrol	Źródło
Charakterystyczny pik karwakrolu	1173 cm <sup>-1</sup>	-	1178 cm <sup>-1</sup>	[150]
Charakterystyczny pik karwakrolu	1249 cm <sup>-1</sup>		1257 cm <sup>-1</sup>	[150]
Alifatyczne –CH <sub>2</sub> /–CH <sub>3</sub> drgania rozciągające	2958, 2926, and 2868 cm <sup>-1</sup>	-	Owertyony z drganiami rozciągającymi CH <sub>2</sub> w poliamidzie	[150], [151], [152]
–OH drgania rozciągające	3378 cm <sup>-1</sup>	-	Owertyony z silnymi drganiami rozciągającymi N–H w poliamidzie	[150], [151], [152]
N–H drgania rozciągające	-	3299 and 3076 cm <sup>-1</sup>	3298 and 3065 cm <sup>-1</sup>	[153], [154]
CH <sub>2</sub> asymetryczne drgania rozciągające	-	2933 cm <sup>-1</sup>	2933 cm <sup>-1</sup>	[153], [154], [155]
CH <sub>2</sub> symetryczne drgania rozciągające	-	2859 cm <sup>-1</sup>	2859 cm <sup>-1</sup>	[153], [154], [155]
C=O drgania rozciągające grupy amidowej	-	1631 cm <sup>-1</sup>	1630 cm <sup>-1</sup>	[153], [154], [155]
N–H drgania nożycowe grupy amidowej	-	1536 cm <sup>-1</sup>	1534 cm <sup>-1</sup>	[153], [154], [155]
O=C–N drgania nożycowe	-	689 cm <sup>-1</sup>	688 cm <sup>-1</sup>	[155]

W widmie niezmodyfikowanej membrany poliamidowej można wyselekcjonować charakterystyczne pasma dla poliamidu. Pasma przy 3299 i 3076 cm<sup>-1</sup> pochodzą z drgań rozciągających N–H [153], [154].

Pasma przy 2933 i 2859  $\text{cm}^{-1}$  oznaczono jako asymetryczne i symetryczne drgania rozciągające grupy  $-\text{CH}_2$ . Pasma przy 1631  $\text{cm}^{-1}$  przypisano drganiom rozciągającym grupy amidowej  $\text{C}=\text{O}$ , natomiast pasmo przy 1536  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadało drganiom nożycowym grupy amidowej  $\text{N}-\text{H}$  [153], [154], [155]. Pasma przy 689  $\text{cm}^{-1}$  przypisano do drgań nożycowych grupy  $\text{O}=\text{C}-\text{N}$  [155]. W widmie zaimpregnowanej membrany pojawiły się nowe pasma w zakresie od 800 do 1200  $\text{cm}^{-1}$ , będącym obszarem „odcisku palca” (*ang. fingerprint*) dla związków aromatycznych [152], [156]. Pasma 810  $\text{cm}^{-1}$  przypisano do drgań pozapłaszczyznowych grupy  $\text{C}-\text{H}$  [150], [152]. Kluczowym charakterystycznym pikiem karwakrolu było pasmo 865–870  $\text{cm}^{-1}$  [151], [152]. Pasma przy 995  $\text{cm}^{-1}$  i pik przy 1114–1121  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadały odpowiednio substytucji 1:2:4 i orto karwakrolu [150],[151],[152]. Charakterystyczne pasma obu widm przedstawiono w Tabeli 3.1.

Analizując widmo FTIR obecność wiązań wodorowych można wykryć jako przesunięcie pasma grupy funkcyjnej w stronę niższej liczby falowej, czemu może towarzyszyć pojawienie się szerszego pasma [157], [158]. Kaziran i Martirosyan [157] wykazali oddziaływania (wiązania wodorowe) pomiędzy grupą karbonylową poliwinylpiperolidonu (PVP) a grupą hydroksylową ibuprofenu za pomocą FTIR. Drgania rozciągające odpowiadające grupie  $\text{C}=\text{O}$  PVP zostało przesunięte w stronę niższej liczby falowej (od 1682 do 1636  $\text{cm}^{-1}$ ), co przypisano wiązaniom wodorowym. W przeciwieństwie do PVP, w poliamidzie pomiędzy łańcuchami polimeru występują silne wiązania wodorowe (Rysunek 3.3). Podczas SSI, obecność karwakrolu interferuje z już istniejącymi wiązaniami pomiędzy łańcuchami polimeru, tworząc własne wiązania w tych samych miejscach, więc zmiany będą mniej widoczne w widmach FTIR. Konsekwencją tego zjawiska jest jednak możliwość występowania w polimerze dużych ładunków karwakrolu, osiągalnych jedynie w przypadku występowania silnych oddziaływań pomiędzy polimerem a substancją aktywną [146]. Zjawisko pęcznienia polimeru jest kolejnym dowodem na istnienie oddziaływań pomiędzy polimerem a substancją aktywną. Zjawisko to będzie dokładnie opisane w kolejnym rozdziale (Rozdział 3.1.2.2).

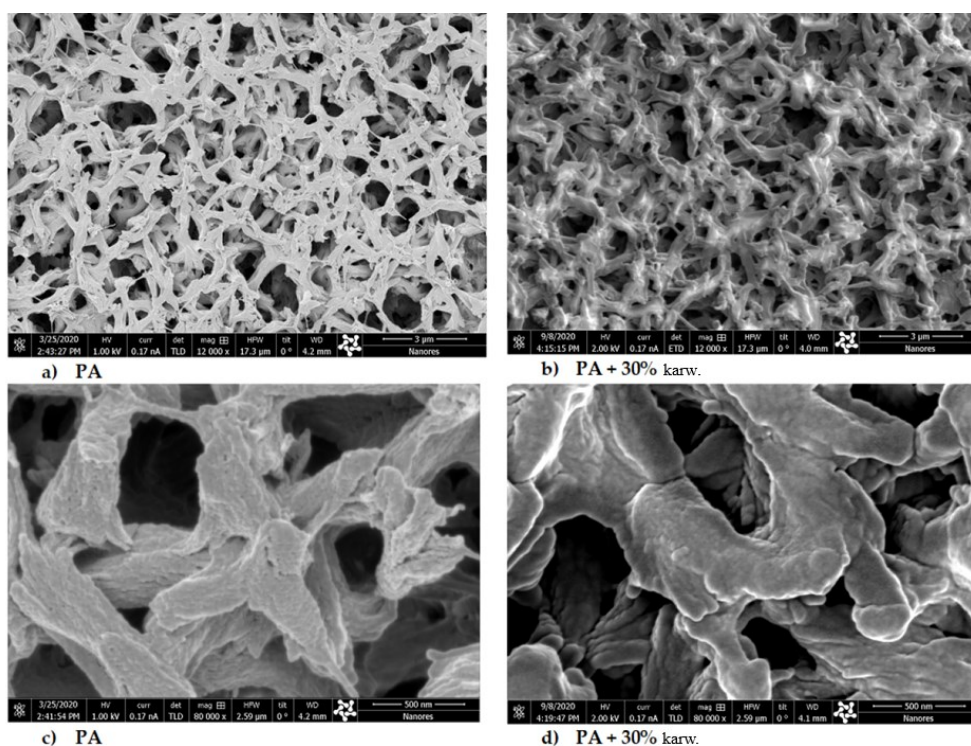
Analizując widma poprzez powiększenie obszarów drgania rozciągającego  $\text{C}=\text{O}$ , drgań nożycowych  $\text{N}-\text{H}$  i drgań rozciągających  $\text{N}-\text{H}$  niezaimpregnowanego i zaimpregnowanego poliamidu ujawniło lekko przesunięte pasma w kierunku niższej liczby falowej w impregnowanym polimerze. W obszarze drgań rozciągających  $\text{C}=\text{O}$  w impregnowanej próbce wykryto szersze pasmo rozciągające  $\text{C}=\text{O}$ , z niewielkim przesunięciem piku od 1631 do 1630  $\text{cm}^{-1}$ . W tym samym widmie zauważono także pojawienie się nowego słabego pasma przy 1590  $\text{cm}^{-1}$ . Nowe pasmo można przypisać drganiom rozciągającym aromatycznej grupy  $\text{C}=\text{C}$  [159] w karwakrolu. Najbardziej znaczące przesunięcie wykryto dla drgań rozciągających  $\text{N}-\text{H}$  z 3076 do 3065  $\text{cm}^{-1}$ . Zaobserwowane przesunięcia nie były tak duże jak dla PVP, ponieważ w impregnowanym poliamidzie jedne wiązania wodorowe zostały zastąpione przez inne. Powiększenia obszarów drgania rozciągającego  $\text{C}=\text{O}$ , drgania nożycowego  $\text{N}-\text{H}$  oraz drgania rozciągającego  $\text{NH}$  przedstawiono w załączniku na Rysunku Z.2.

Efekt przesunięcia pików został sprawdzony przy zastosowaniu jeszcze większego ładunku karwakrołu: 40% oraz 54%. Uzyskano podobne rezultaty względem ukazanych powyżej. Wyniki przedstawiono w załączniku na Rysunku Z.3.

### 3.1.1.2 Wpływ impregnacji karwakrolem na strukturę membrany poliamidowej

W Rozdziale 3.1.1 przedstawiono, że wyższe ładunki karwakrołu (jak i jego izomeru – tymolu) są możliwe dzięki powstaniu wiązań wodorowych między grupami funkcyjnymi polimeru a grupą hydroksylową substancji aktywnej. Jednak wiązanie wodorowe z karwakrolem osłabia oddziaływania elektrostatyczne między samymi łańcuchami polimerowymi, prowadząc tym samym do trwałego pęcznienia polimeru. Koniecznym jest zbadanie efektu pęcznienia na mikrostrukturę i wydajność membran. Efekty te zostały zbadane przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) i wiązki jonów oraz testów filtracji krzyżowej.

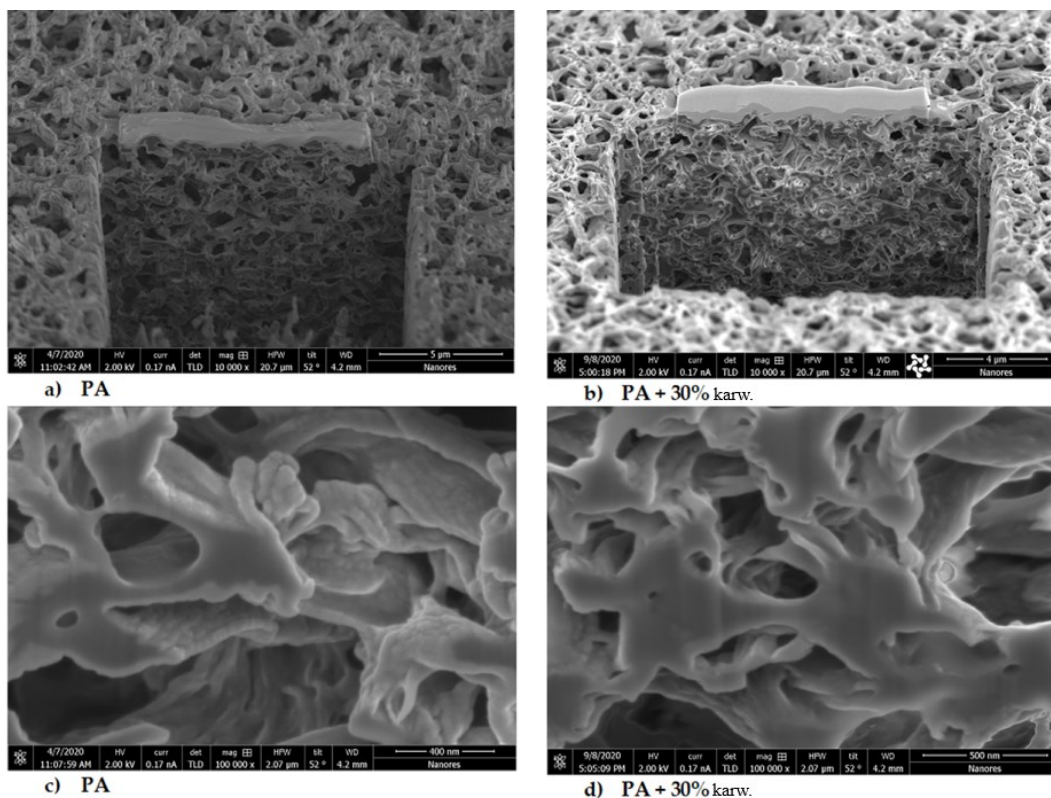
W badaniu Zizovic i in. [143] efekt pęcznienia był nieznacznie widoczny w membranach poliamidowych z 20% tymolem i wyraźnie widoczny w próbkach z 35% ładunkiem tymolu. Poniżej przedstawiono obrazy SEM powierzchni niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych membran poliamidowych z około 30% mas. ładunkiem karwakrołu (Rysunek 3.6). Na zdjęciu SEM z podziałką 3  $\mu\text{m}$  nie można dostrzec żadnych zmian w wyglądzie powierzchni membrany (Rysunek 3.6a, b). Jednak przy podziałce 500 nm (Rysunek 3.6c, d) ujawniło mniej widoczną strukturę przypominającą guzki w próbce z 30% ładunkiem karwakrołu, co wskazuje na zjawisko pęcznienia polimeru.



Rysunek 3. 6 Zdjęcia SEM powierzchni niezaimpregnowanej membrany poliamidowej (PA) i membrany poliamidowej z 30% wag. karwakrołu (PA 30% karw.). Podziałka = 3  $\mu\text{m}$  na mikrografiach (a,b); Podziałka = 500 nm na mikrografiach (c,d).



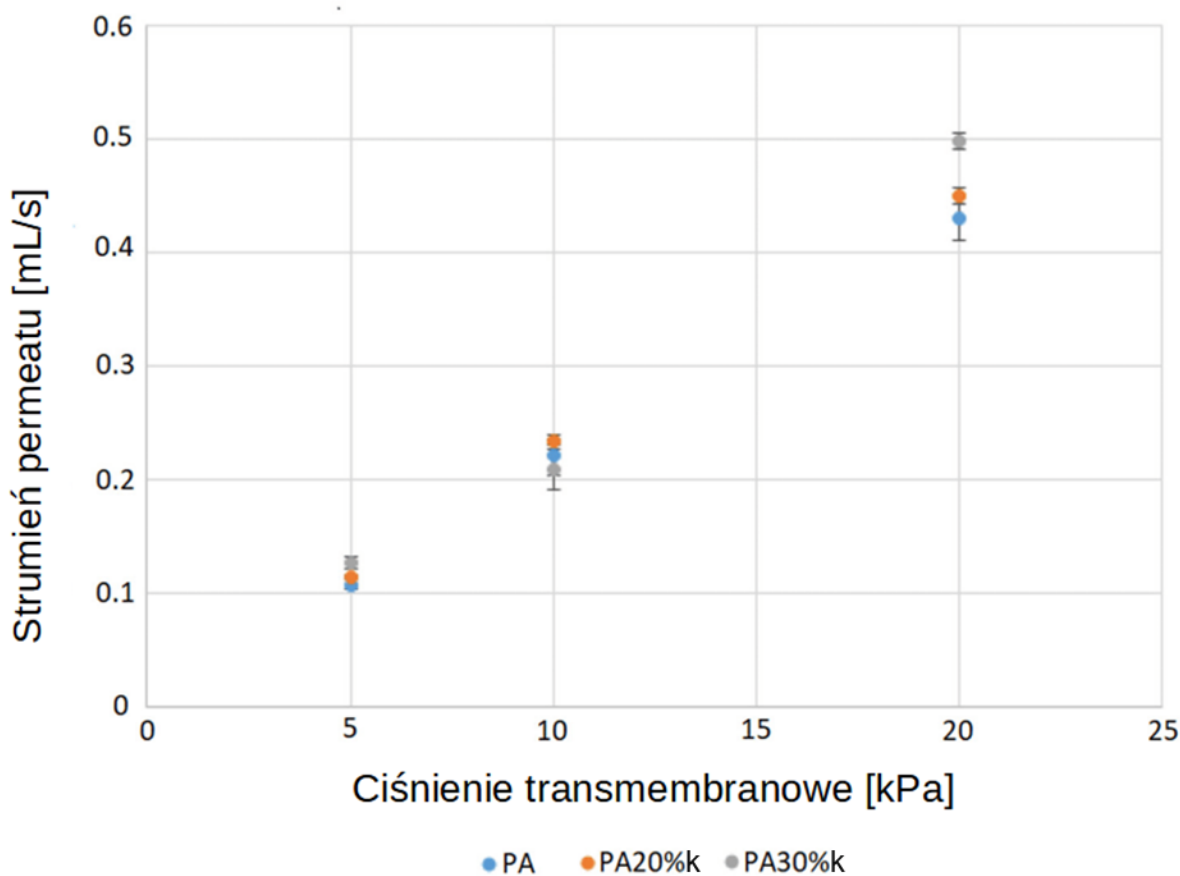
Połączenie SEM i skupionej energii wiązki jonów galu pozwoliło na wykonanie przekroju poprzecznego podczas analiz SEM. Zdjęcia SEM przekrojów poprzecznych niezmodyfikowanych i modyfikowanych membran z 30% wag. karwakrolu przedstawiono na Rysunku 3.7. Przy podziale 500 nm nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w strukturze membrany (Rysunek 3.7 a, b). Większe powiększenie ujawniło efekt pęcznienia i mniej widoczną strukturę polimerową przypominającą guzki w próbce zawierającej 30% karwakrolu.



Rysunek 3. 7 Zdjęcia SEM przekrojów niezmodyfikowanej membrany poliamidowej (PA) i membrany poliamidowej z 30% mas. karwakrolu (PA 30% karw.). Na mikrografach (a-d) wartości podziałki wynoszą odpowiednio 5 µm, 4 µm, 400 nm i 500 nm.

W celu zbadania wpływu pęcznienia na wydajność filtracyjną membrany przeprowadzono dodatkowo testy w systemie filtracji krzyżowej. Przepływ strumienia wody destylowanej przez membranę mierzono dla różnych ciśnień transmembranowych dla niezmodyfikowanej membrany poliamidowej i zaimpregnowanych membran z zawartością karwakrolu w zakresie 20-43% wag. Membrany o załadunku poniżej 30% wykazywały podobne zachowanie do tych niezaimpregnowanych. Jednakże membrany z załadunkiem karwakrolu w zakresie 30-43% wykazały około 10% wyższe natężenie przepływu strumienia permeatu dla ciśnienia transmembranowego wynoszącego 20 kPa. Dane uzyskane dla niezmodyfikowanej membrany poliamidowej i membran o załadunku karwakrolem 20% i 30% pokazano na Rysunku 3.8. W badaniu Zizovic i in. [143] uzyskano porównywalne wyniki, w których membrana poliamidowa z 20% załadunkiem tymolu miała natężenie przepływu permeatu niezmodyfikowanej membrany. To samo badanie wykazało, jednakże iż membrana z 35% załadunkiem tymolu wykazała

niewielki wzrost strumienia permeatu. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że nie nastąpiła znacząca zmiana w mikrostrukturze i funkcjonalności membrany z powodu efektu pęcznienia.



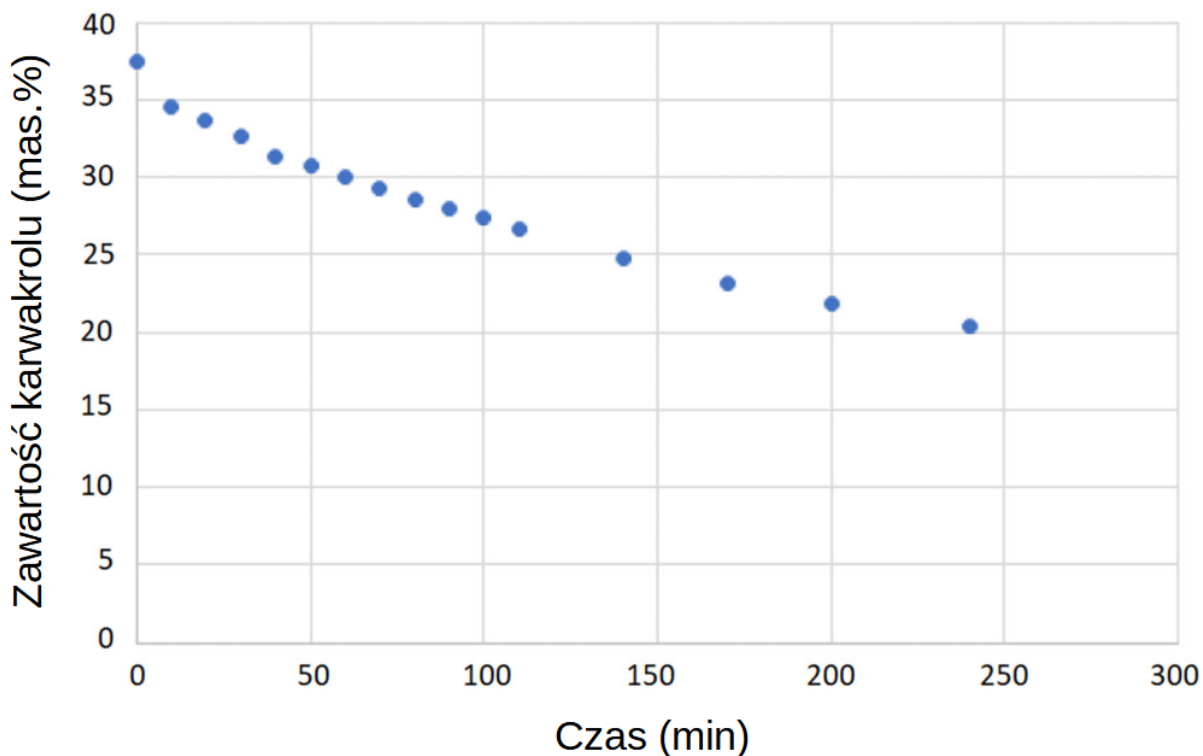
Rysunek 3. 8 Strumień permeatu przez niezmodyfikowaną membranę poliamidową (PA) i membrany z 20% (PA20%k) i 30% (PA30%k) karwakrolu.

Należy podkreślić, że w membranach z tym samym ładunkiem karwakrolu, wytworzonych w różnych warunkach procesowych SSI (tj.: ciśnienie, czas impregnacji), nie zaobserwowano żadnych różnic w analizach SEM i FTIR oraz testach filtracji krzyżowej. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami wcześniejszych badań poliamidu [143], [144] i octanu celulozy [160], [161] zmodyfikowanych metodą SSI tymolem, gdzie występuje to samo zjawisko pojawienia się wiązań wodorowych i wysokiego załadunku substancją aktywną. Dalsze badania potwierdziły, że właściwości fizyczne, kinetyka uwalniania i aktywność biologiczna końcowego materiału zależą tylko od załadunku substancją czynną, a nie od warunków procesowych SSI.

### 3.1.1.3 Uwalnianie karwakrolu w CO<sub>2</sub>

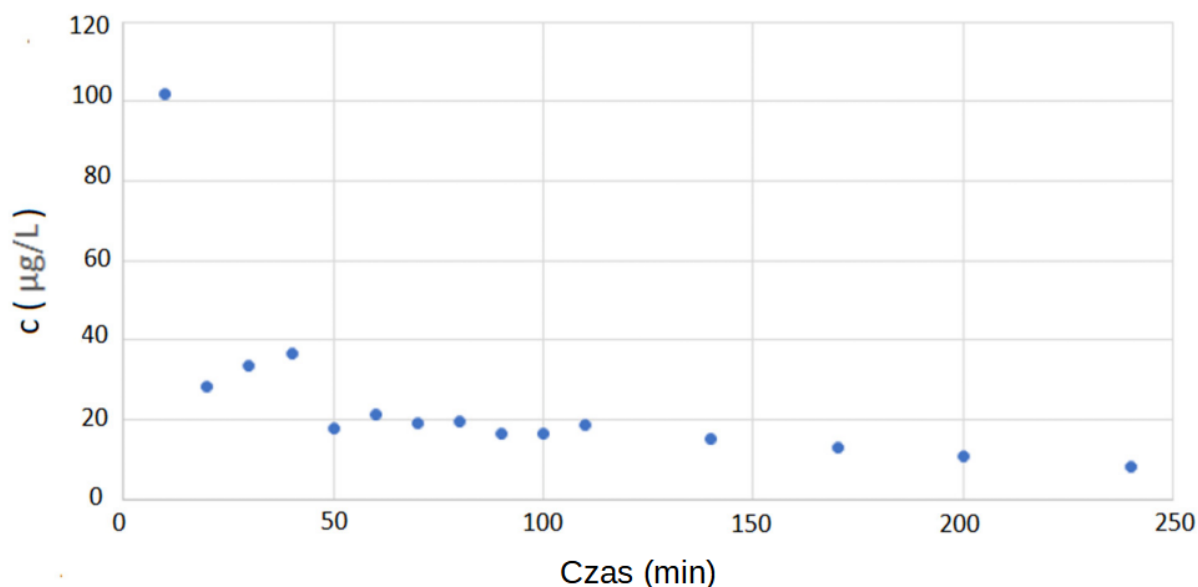
W Rozdziale 2.3.5 opisano potencjalne zastosowanie membrany zaimpregnowanej karwakrolem jako filtra antybakteryjnego z substancją aktywną w celu wdmuchiwania jej wraz z CO<sub>2</sub> do rany operacyjnej. W tym celu należy określić, czy karwakrol zaimpregnowany do struktury membrany będzie uwalniany wraz

z przepływem CO<sub>2</sub>. Do eksperymentów wybrano natężenie przepływu CO<sub>2</sub> przez membranę wynoszące 5 L/min. Stalowy moduł filtracyjny użyty w eksperymentach do filtracji krzyżowej podłączono do naczynia wysokociśnieniowego napełnionego CO<sub>2</sub>, który utrzymywał stałe ciśnienie 2,5 MPa. Przepływ CO<sub>2</sub> regulowano zaworem, wykorzystując znajdujący się za modułem filtracyjnym rotametr. Wyniki uwalniania karwakrolu przedstawiono na Rysunku 3.9.



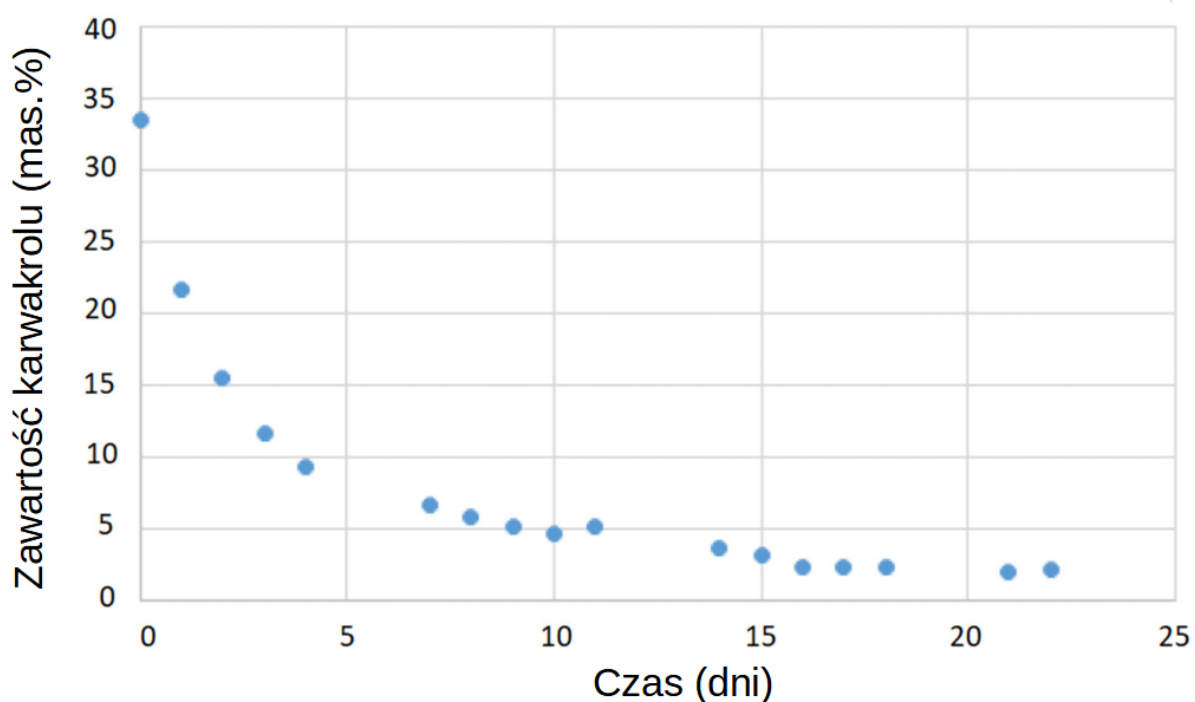
Rysunek 3. 9 Zawartość karwakrolu w membranie w funkcji czasu (natężenie przepływu CO<sub>2</sub>: 5 L/min, początkowa zawartość karwakrolu: 37%)

Szybkość uwalniania karwakrolu była bliska liniowości po pierwszych 100 minutach, ze średnim zmniejszeniem ładunku karwakrolu o około 5% na godzinę przepływu CO<sub>2</sub> lub o około 5,5 mg na godzinę. W strumieniu CO<sub>2</sub> za membraną średnie stężenie karwakrolu w CO<sub>2</sub> wynosi 18,3 g/L. Stężenie karwakrolu w CO<sub>2</sub> w funkcji czasu pokazano na Rysunku 3.10.



Rysunek 3. 10 Stężenie karwakrolu w ditlenku węgla w funkcji czasu (natężenie przepływu  $CO_2$ : 5 l/min, początkowa zawartość karwakrolu: 37%).

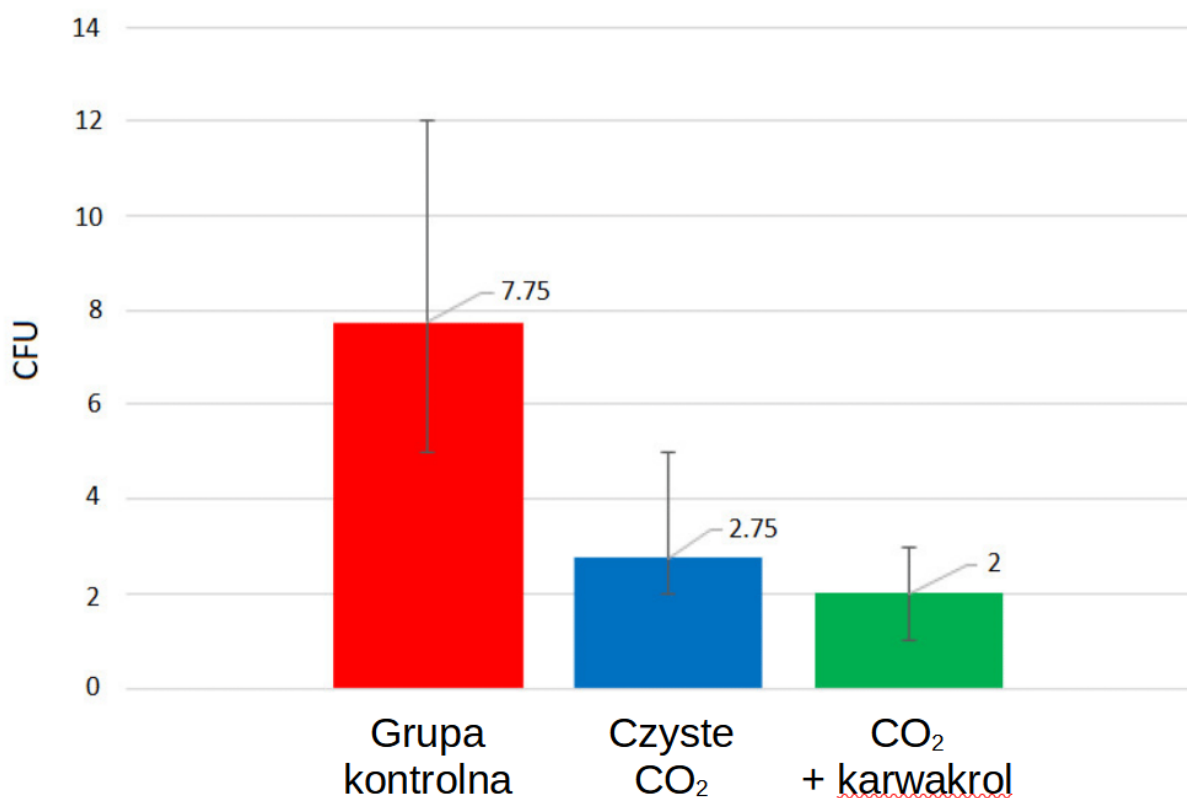
Zaprezentowane wartości potwierdzono w doświadczeniach na membranach o różnym stężeniu karwakrolu od 30 do 43% i czasie uwalniania wynoszącym 4 godziny. Jednakże możliwe jest uwolnienie prawie całego karwakrolu z membran poliamidowych, co ilustruje jego uwalnianie w powietrzu. Wyniki zaprezentowano na Rysunku 3.11. Ze względu na dużą lotność karwakrolu, do przechowywania impregnowanych membran zaleca się szczelne opakowania.



Rysunek 3. 11 Uwalnianie karwakrolu poprzez dyfuzję naturalną "na powietrzu" w średniej temperaturze  $25^\circ C$

### 3.1.1.4 Wyniki zastosowania modelu klatki piersiowej

Model otwartej klatki piersiowej, podobny do tego stosowanego przez Perssona i van der Lindena [130], został wykorzystany do porównania skażenia bakteriami unoszącymi się w powietrzu podczas wdmuchiwanie przy użyciu niezaimpregnowanej membrany poliamidowej oraz zaimpregnowanej karwakrolem. Dla porównania przeprowadzono także doświadczenia bez wdmuchiwanie CO<sub>2</sub>. Model otwartej rany operacyjnej zawierał dwie standardowe agarowe płytki z krwią o średnicy 9 cm. Zestaw eksperymentalny pokazano na Rysunku 2.5, a procedurę opisano szczegółowo w Rozdziale 2.3.5. Eksperyment przeprowadzono w pięciu powtórzeniach, każdy trwający godzinę. W badaniach wykorzystano membranę o zawartości karwakrolu od 30 do 34%. Średnie wartości wykrytego zanieczyszczenia, reprezentujące liczbę kolonii (CFU), z maksymalnymi odchyleniami od średniej, pokazano na Rysunku 3.12.



Rysunek 3. 12 Poziomy skażenia wykryte bez wdmuchiwanie CO<sub>2</sub> (czerwony), z wdmuchiwanie przy użyciu niezmodyfikowanej membrany poliamidowej (niebieski) i wdmuchiwanie przy użyciu membrany wypełnionej karwakrolem (zielony).

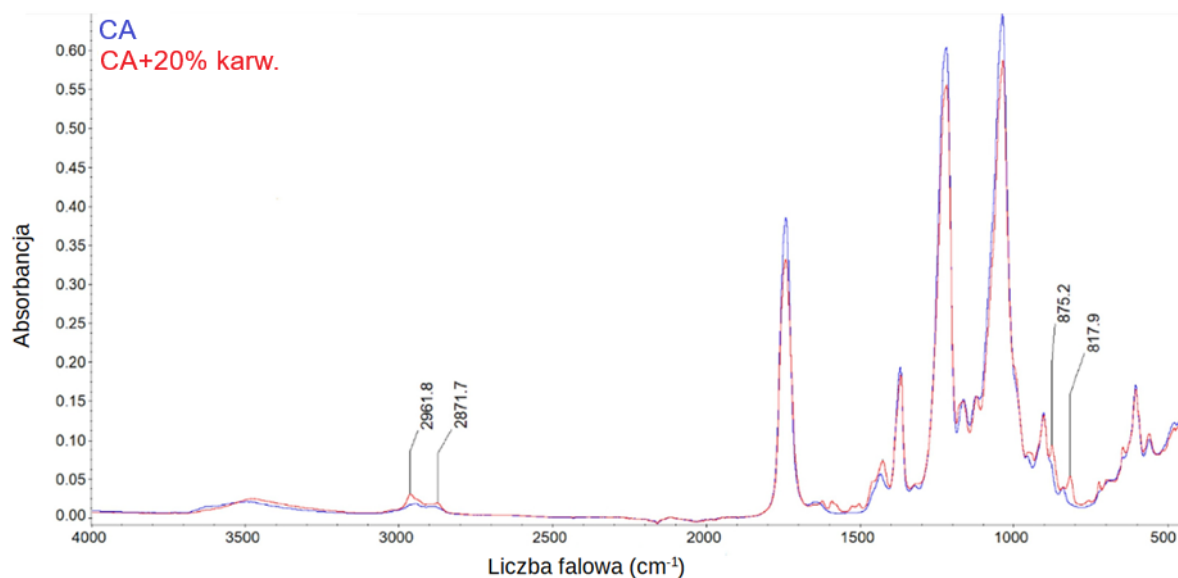
Jak widać, wdmuchiwanie CO<sub>2</sub> znacząco zmniejszyła liczbę wykrytych kolonii bakterii. W rezultacie liczba CFU spadła ze średnio 7,75 (bez przepływu CO<sub>2</sub>) do 2,75 (z przepływem czystego CO<sub>2</sub>). Wniosek ten jest zgodny z Perssonem i van der Lindenem [130], Baumannem i Caterem [162] i pokazuje, że usuwanie powietrza z otwartej jamy poprzez opadający, cięższy CO<sub>2</sub> może zapobiegać bezpośredniemu

zanieczyszczeniu z powietrza podczas operacji serca. Inne eksperymenty w naszym badaniu wykazały, że zastosowanie membran zawierających karwakrol zamiast niezmodyfikowanych membran poliamidowych pozwoliło na dalsze zmniejszenie poziomu zanieczyszczenia o 27% (zmniejszenie średniego poziomu CFU z 2,75 do 2). Tak znaczna redukcja zanieczyszczeń uzasadnia potencjał struktur polimerowych załadowanych substancjami antybakteryjnymi do wdmuchiwania antybakteryjnych przy pomocy CO<sub>2</sub> podczas operacji na otwartej jamie klatki piersiowej.

### 3.1.2 Charakteryzacja i aplikacja membran z octanu z octanu celulozy

#### 3.1.2.1 Analiza FTIR

Przeprowadzona analiza FTIR służy wykazaniu obecności karwakrolu na zaimpregnowanej powierzchni materiału. Widma FTIR dla niezaimpregnowanej membrany z octanu celulozy oraz zaimpregnowanej karwakrolem zawierającej 20% karwakrolu zaprezentowano na Rysunku 3.13.



Rysunek 3. 13 Widma podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) niezmodyfikowanej i impregnowanej membrany z 20% karwakrolem .

W widmie niezaimpregnowanej membrany widoczne są charakterystyczne pasma dla octanu celulozy. Szerokie pasmo około 3500 cm<sup>-1</sup> pochodzi z drgania rozciągającego grupy hydroksylowej (-OH) [160], [163], [164]. Pik 1741 cm<sup>-1</sup> jest przypisany do drgań rozciągających grupy –CO [160], [163], [165]. Piki przy 1219, 1367 i 1433 cm<sup>-1</sup> przypisuje się odpowiednio drganiom deformacyjnym: wachlarzowym, wahadłowym i nożycowym –CH [160], [166], [167]. Pik w 901 cm<sup>-1</sup> jest charakterystyczny dla sacharydu, a pik w 1036 cm<sup>-1</sup> pochodzi z jednostki glikozydowej C-O-C [156], [164], [168].

Widoczne są nowe piki w widmie dla zaimpregnowanej karwakrolem membrany. Nowy pik jest widoczny około 817 cm<sup>-1</sup> pochodzący od pozapłaszczyznowych drgań deformacyjnych wachlarzowych grupy –CH. Kluczowym, charakterystycznym dla karwakrolu pikiem widocznym w 875 cm<sup>-1</sup> [150] jest

pozapłaszczyznowe drganie rozciągające aromatycznego wiązania -CH [169]. Nowe pasma w zakresie 1400 – 1600  $\text{cm}^{-1}$  pochodzą z aromatycznych nienasyconych pierścieni w cząsteczce karwakrolu, szczególnie z drgań rozciągających węgiel-węgiel [151], [169], [169]. Nowe charakterystyczne dla karwakrolu piki w 2961 i 2871  $\text{cm}^{-1}$  są przypisane do drgań rozciągających dla grupy  $-\text{CH}_3$  charakterystycznej dla związków alifatycznych [150], [151], [152]. Porównanie występujących pasm octanu celulozy, karwakrolu (zgodnie z Rysunkiem 3.5a i Tabelą 3.1) oraz zaimpregnowanego karwakrolem octanu celulozy przedstawiono zbiorczo w Tabeli 3.2

Tabela 3. 2 Wykaz charakterystycznych pików w widmach FTIR: karwakrolu, octanu celulozy, zaimpregnowanego karwakrolem octanu celulozy wraz z ich długościami falowymi

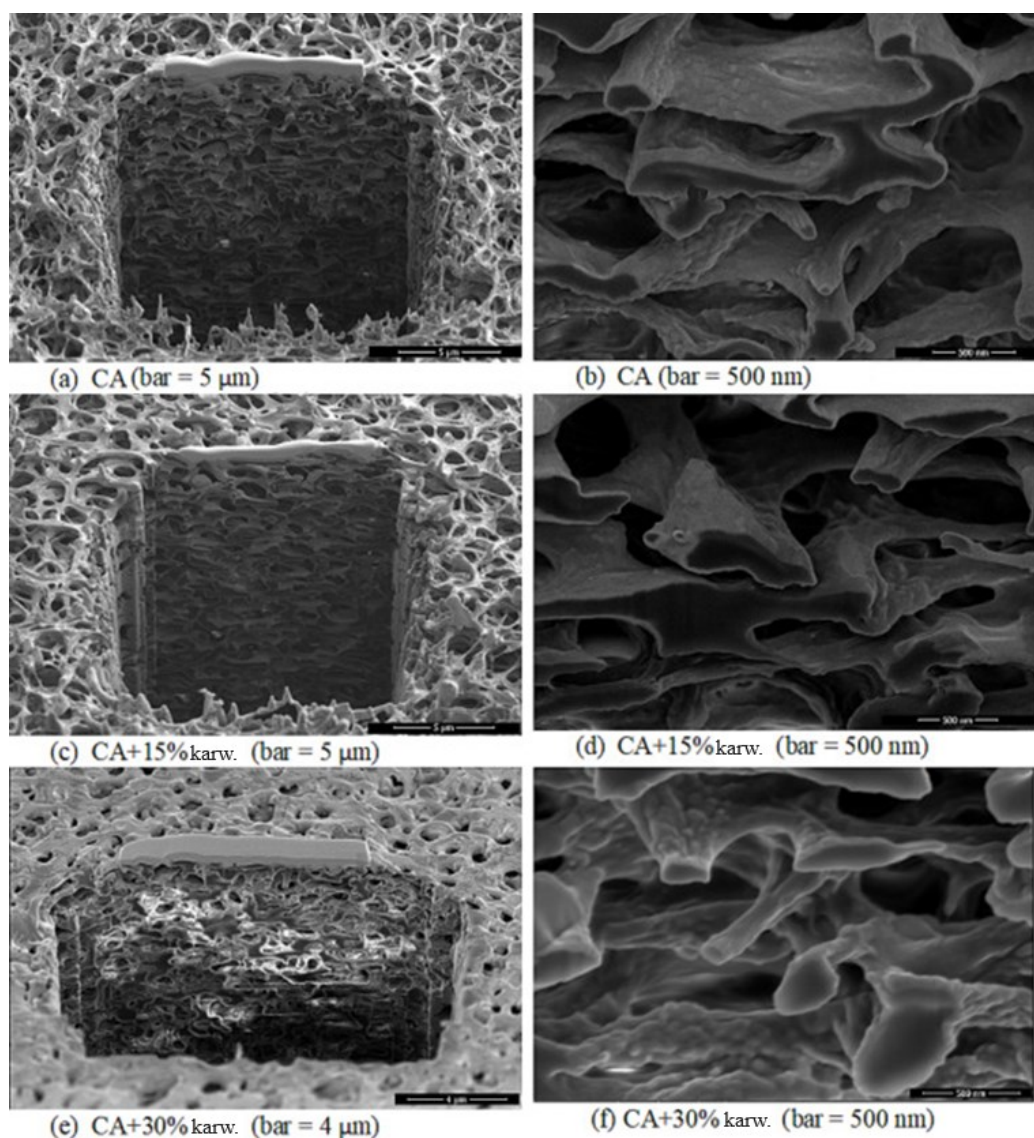
Przypisanie	Karwakrol	Octan		Źródło
		Octan celulozy	celulozy+ Karwakrol	
C-H pozapłaszczyznowe drgania wachlarzowe	811 $\text{cm}^{-1}$		817 $\text{cm}^{-1}$	[141], [150], [152]
Charakterystyczny pik karwakrolu; pozapłaszczyznowe drgania rozciągające – CH	864 $\text{cm}^{-1}$		875 $\text{cm}^{-1}$	[150], [169]
charakterystyczny pik dla sacharydu	-	901 $\text{cm}^{-1}$	901 $\text{cm}^{-1}$	[164], [168], [170]
Karwakrol 1:2:4 substytucja	994 $\text{cm}^{-1}$		995 $\text{cm}^{-1}$	[150], [151], [152]
jednostka glikozydowa C-O-C	-	1036 $\text{cm}^{-1}$	1030 $\text{cm}^{-1}$	[164], [168], [170]
CH drgania wachlarzowe	-	1219 $\text{cm}^{-1}$	1219 $\text{cm}^{-1}$	[160], [166], [167]
Charakterystyczny pik karwakrolu	1249 $\text{cm}^{-1}$		1257 $\text{cm}^{-1}$	[150]
CH drgania wahadłowe	-	1367 $\text{cm}^{-1}$		[166], [167], [171]
CH drgania nożycowe	-	1433 $\text{cm}^{-1}$		[166], [167], [171]

<b>Przypisanie</b>	<b>Karwakrol</b>	<b>Octan celulozy</b>	<b>Octan celulozy+ Karwakrol</b>	<b>Źródło</b>
C=O drgania rozciągające	-	1741 cm <sup>-1</sup>		[163], [165], [171]
Alifatyczne -CH <sub>2</sub> /-CH <sub>3</sub> drgania rozciągające	2958, 2926, and 2868 cm <sup>-1</sup>		2871, 2961 cm <sup>-1</sup>	[151], [152]
-OH drgania rozciągające	3378 cm <sup>-1</sup>	3600 cm <sup>-1</sup>		[163], [164], [171]

### 3.1.2.2 Wpływ impregnacji karwakirolelem na strukturę membrany z octanu celulozy

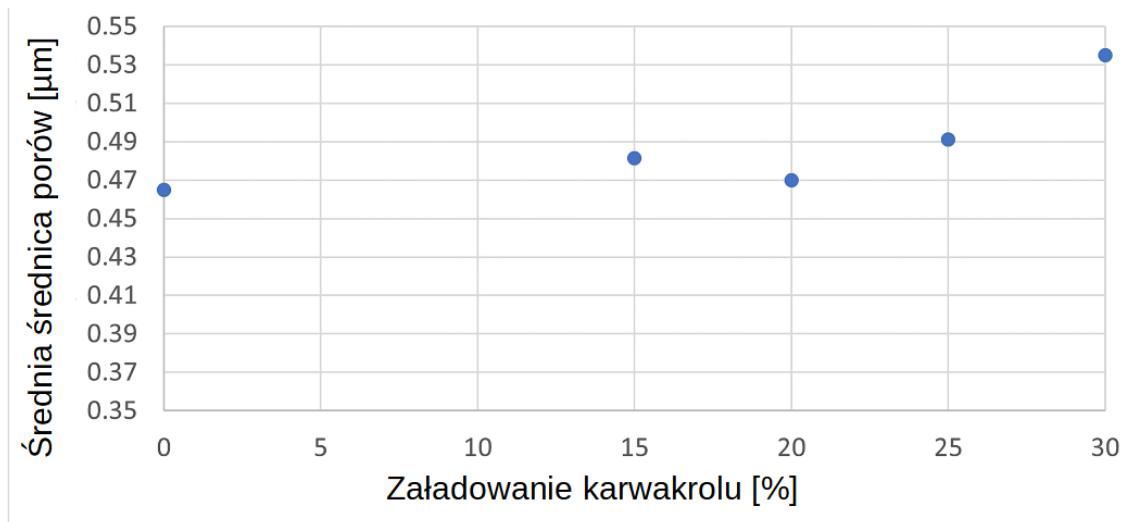
W wyniku impregnacji nadkrytycznej karwakirolelem dochodzi do powstania wiązań wodorowych między grupą hydroksylową karwakirolu a grupami funkcyjnymi octanu celulozy (grupami hydroksylowymi i karbonyłowymi) [81], [149] (Rysunek 3.4). W konsekwencji prowadzi to do osłabienia struktury polimeru i jego pęcznienia. Na Rysunku 3.14 przedstawiono zdjęcia SEM przekrojów niezmodyfikowanej membrany z octanu celulozy oraz membran zaimpregnowanych w 15% i 30% karwakirolelem. Zdjęcia te otrzymano za pomocą mikroskopii dwuwiązkowej SEM/FIB. Porównanie przekrojów pozwala zaobserwować efekt pęcznienia w próbce z 30% załadunkiem karwakirolu. Zastosowanie podziałki 500 nm w szczególności pozwala zaobserwować efekt pęcznienia, co ukazuje Rysunek 3.14f z podziałką 500 nm.





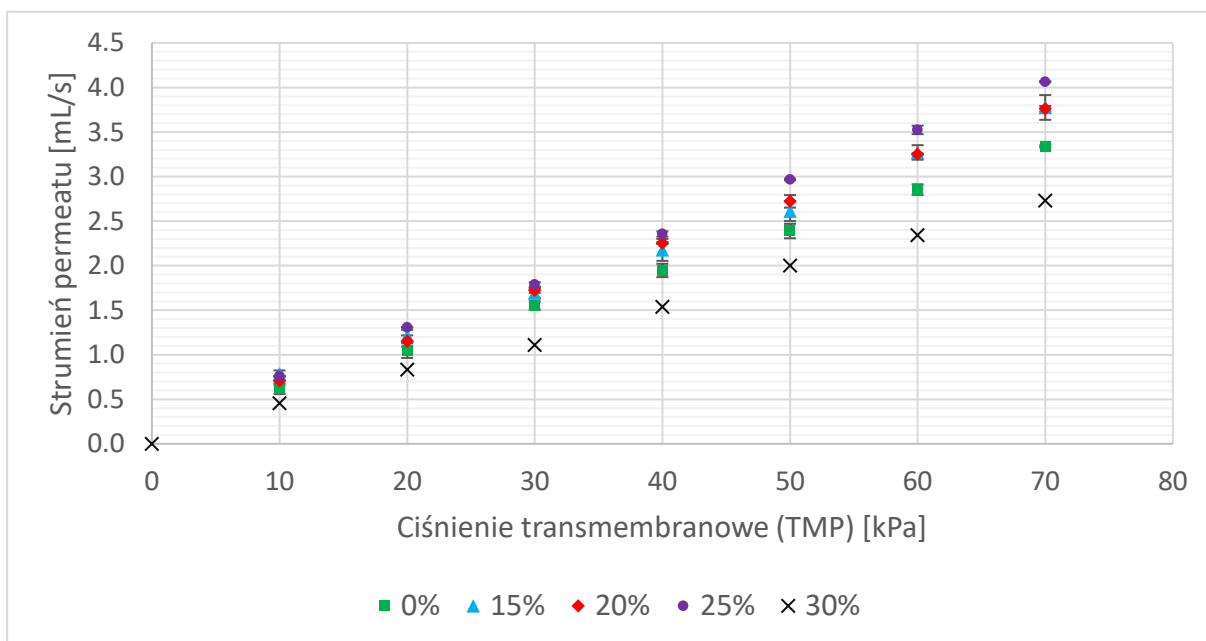
Rysunek 3. 14 Zdjęcia SEM/FIB przekrojów membran z octanu celulozy – (a) i (b) niezaimpregnowana membrana; (c) i (d) membrana z 15% zawartością karwakrołu; (e) i (f) membrana z 30% zawartością karwakrołu.

Zaprezentowane w artykule [140] wyniki analizy porozymetrycznej ukazane na Rysunku 3.15 potwierdzają powyższą obserwację. Średnia wartość średniej średnicy porów, z kilku pomiarów uzyskanych dla membran zawierających 0–25% karwakrołu mieściła się w zakresie od 0,465 do 0,495  $\mu\text{m}$ . W próbce z 30% karwakrolem zaobserwowano większą średnią średnicę porów wynoszącą 0,535  $\mu\text{m}$ . Wynik ten wskazuje na deformację membrany spowodowaną jej pęcznieniem.



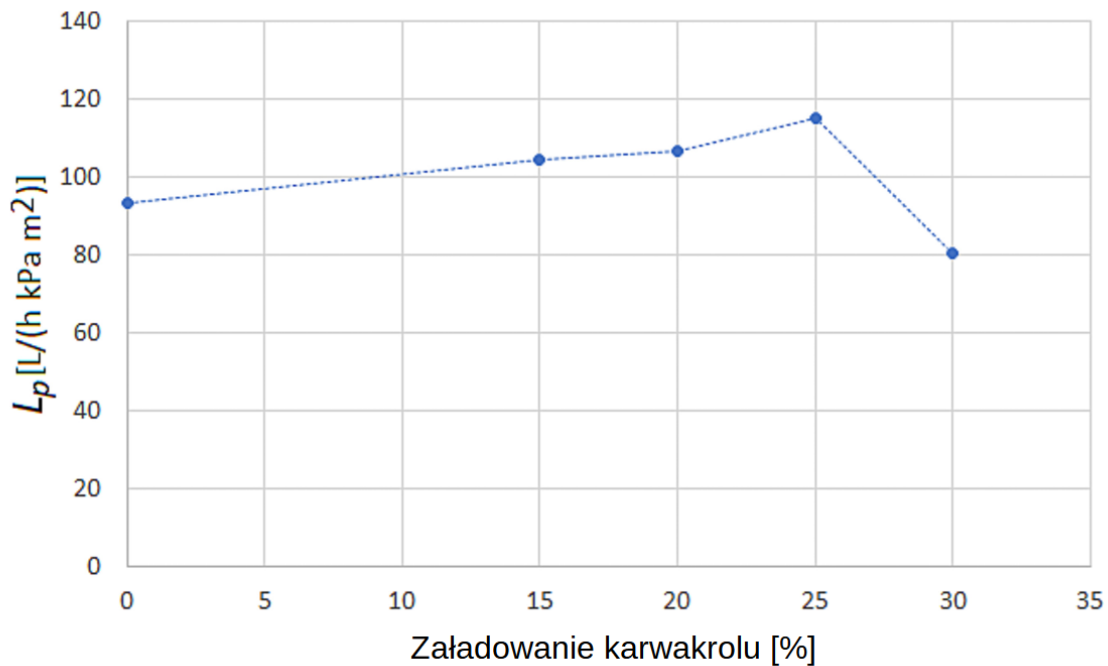
Rysunek 3. 15 Średnia średnica porów w funkcji zawartości karwakrolu (średnia wartość z 2 do 4 pomiarów).

Wpływ impregnacji na funkcjonalność membran zbadano w jednostce filtracyjnej o przepływie krzyżowym. W eksperymencie mierzono strumień permeatu wody destylowanej dla różnych ciśnień transmembranowych (*ang. Transmembrane pressure*, w skrócie TMP). Zależność strumienia permeatu od TMP była liniowa dla każdej membrany, co przedstawiono na Rysunku 3.16.



Rysunek 3. 16 Strumień permeatu przez membranę z octanu celulozy w funkcji ciśnienia transmembranowego

W naszej pracy [140] przedstawiono analizę hydrodynamicznej permeacji ( $L_p$ ). Parametr  $L_p$  określający nachylenie zależności ukazanych na Rysunku 3.16, pokazano na Rysunku 3.17. Membrany z zawartością 0–25% karwakrolu wykazują wzrost  $L_p$ . Przy wyższej zawartości karwakrolu (30%),  $L_p$  znacznie spada w wyniku zjawiska pęcznienia. Dlatego do dalszych badań wybrano membrany z zawartością karwakrolu 0–25%.



Rysunek 3. 17 Przenikanie hydrodynamiczne ( $L_p$ ) w funkcji zawartości karwakrołu.

Wyniki przedstawione na Rysunkach 3.15 i 3.17 wskazują, że najwyższa średnia średnica porów odpowiada najniższej  $L_p$ . Ta zależność może wydawać się paradoksalna, jednakże zgodnie z równaniem Hagen-Poiseuille'a oraz modelem kapilarnym membrany, ilość płynu przepływającego przez nią jest proporcjonalna do sumy. ( $\sum_i N_i r_i^4$ ):

$$J = \frac{Q}{A} = \frac{\pi}{8\eta l_{por}} (\sum_i N_i r_i^4) \Delta p \quad (3.1)$$

Lub

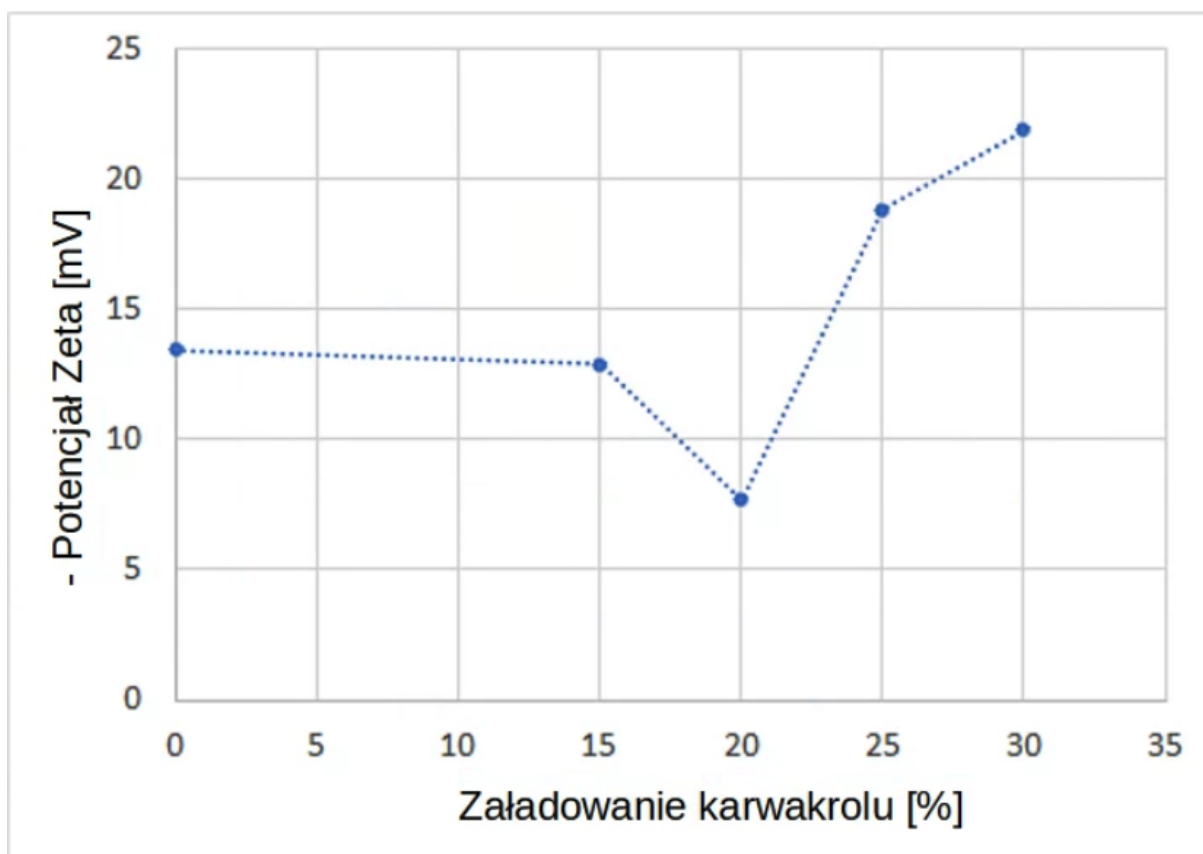
$$L_p = \frac{J}{\Delta p} = \frac{\pi}{8\eta l_{por}} (\sum_i N_i r_i^4) \quad (3.2)$$

Gdzie  $N_i$  - liczba porów o promieniu  $r_i$  na jednostkę powierzchni membrany,  $\eta$  - lepkość płynu przechodzącego przez membranę,  $l_{por}$  - długość porów,  $A$  - suma powierzchni wszystkich otwartych porów. Korzystając z wyników uzyskanych z porozymetru Coultera, obliczono parametr  $L_p \eta$  (Coulter), który jest wprost proporcjonalny do ( $\sum_i N_i r_i^4$ ).

Obliczenia przedstawione w [140] potwierdziły obserwowaną zależność, tzn. wartość  $L_p\eta$  dla membrany z załadunkiem 30% karwakrolu ( $0,050\ \mu\text{m}$ ) była znacznie niższa niż dla membrany niezaimpregnowanej ( $0,060\ \mu\text{m}$ ), podczas gdy dla membrany z załadunkiem 25% karwakrolu uzyskaliśmy najwyższą wartość  $0,062\ \mu\text{m}$ . Tak więc jakościowo zmiany  $L_p\eta$  (Coulter) przy zaimpregnowaniu karwakrolem odpowiadają zmianom  $L_p$  pokazanym na Rysunku 3.17.

Należy nadmienić, że oceniając strumień permeatu wody przez membranę, powinno wziąć pod uwagę, że lepkość wody w porach membrany jest wyższa niż wody destylowanej. Wartość lepkości może również zmieniać się wraz ze zmianą zawartością karwakrolu (bardziej zorientowane na wodę substancja w porównaniu z wolnymi cząsteczkami wody).

W naszym artykule [140] przedstawiono na Rysunku 3.18 wyniki pomiarów potencjału Zeta dla membran. Wyniki wskazują na wzrost ujemnego ładunku membrany przy wysokich załadunkach karwakrolu (25% i 30%) i najwyższym ujemnym ładunku dla membrany załadowanej w 30% karwakrolem. Jest to prawdopodobnie konsekwencją obecności ujemnie naładowanych grup hydroksylowych karwakrolu na powierzchni membrany w dużych stężeniach (widoczne dla 25% i 30% zawartości karwakrolu).

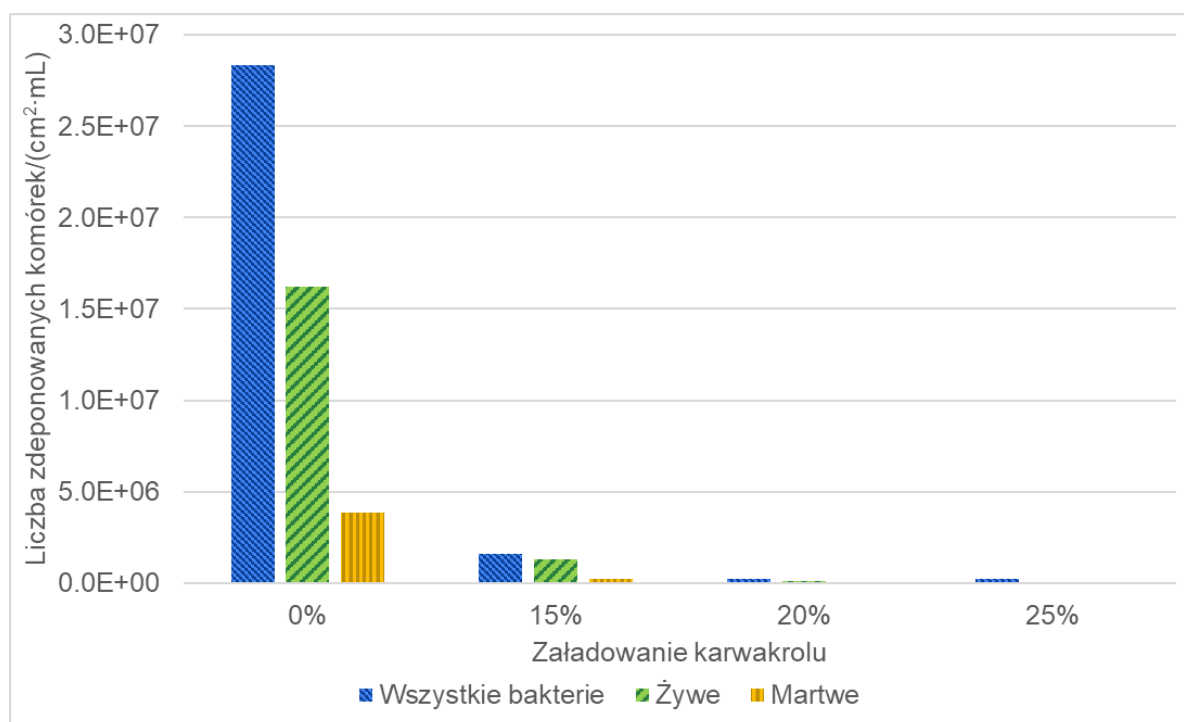


Rysunek 3. 18 Średnia wartość potencjału Zeta z pięciu pomiarów w funkcji zawartości karwakrolu

### 3.1.2.3 Analiza wyników cytometrii przepływowej

Każdy pomiar cytometrii przepływowej wykrywał całkowitą liczbę komórek (w tym żywych i martwych komórek) oddzielonych od membrany na 1 mL zawiesiny bakteryjnej. Dla każdej zawartości karwakrołu przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty i sześć pomiarów cytometrii przepływowej tak jak opisano w Rozdziale 2.3.5. Rysunek 3.19 pokazuje przeliczone wartości średniej liczby bakterii (z sześciu pomiarów) osadzonych na 1 cm<sup>2</sup> powierzchni membrany na 1 mL permeatu.

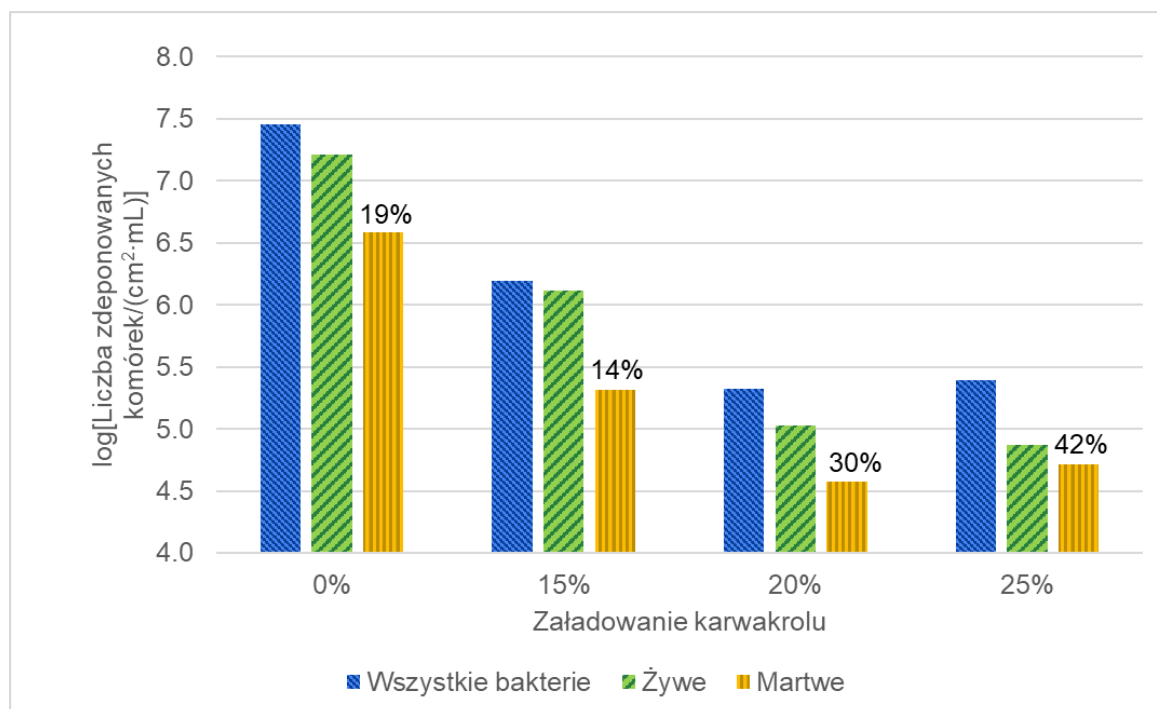
Jak widać, najwyższa depozycja bakterii miała miejsce na niezaimpregnowanej membranie (całkowita liczba wykrytych komórek  $4,92 \cdot 10^7 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; żywe komórki  $2,82 \cdot 10^7 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; martwe komórki  $6,66 \cdot 10^6 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ), a następnie na zaimpregnowanej w 15% karwakrolem membranie (całkowita liczba wykrytych komórek  $2,71 \cdot 10^6 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; żywe komórki  $2,27 \cdot 10^6 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; martwe komórki  $3,55 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ), zaimpregnowana w 25% karwakrolem membrana (całkowita liczba wykrytych komórek  $4,29 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; żywe komórki  $1,28 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; martwe komórki  $8,98 \cdot 10^4 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ) i membrana załadowana w 20% karwakrolem (całkowita liczba wykrytych komórek  $3,65 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; żywe komórki  $1,84 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ; martwe komórki  $6,55 \cdot 10^4 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ).



Rysunek 3. 19 Liczba bakterii osadzonych na membranie na cm<sup>2</sup> jej powierzchni i mL permeatu; membrany z ładunkiem karwakrołu 0–25%.

Dla lepszej widoczności przedstawiono logarytm uzyskanych wartości na Rysunku 3.20, wraz z procentem martwych zabarwionych komórek. Można wywnioskować, że obecność karwakrołu znacznie zmniejszyła depozycję bakterii na membranie podczas filtracji przepływowej, z rzędu wielkości 10<sup>7</sup>/(cm<sup>2</sup>·mL) do

$10^5/(\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ , przy zaobserwowaniu największego odsetka martwych komórek na membranie z 25% karwakrolem (42 %, Rysunek 3.20).



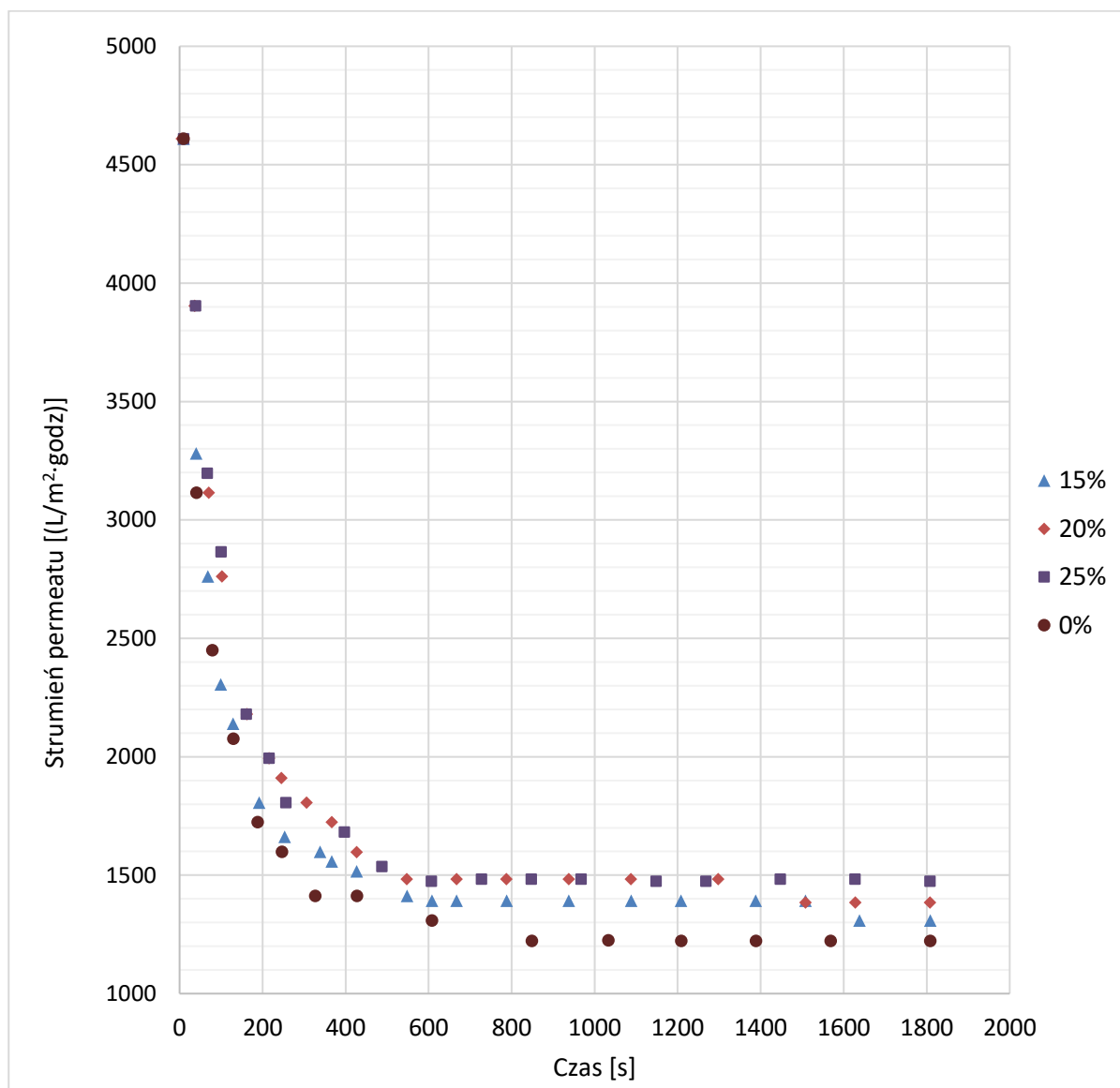
Rysunek 3. 20 Logarytm liczby bakterii osadzonych na membranie na  $\text{cm}^2$  jej powierzchni i  $\text{mL}$  permeatu; membrany z ładunkiem karwakrolu 0-25%. Procent nad żółtymi kolumnami pokazuje udział bakterii martwych w ogólnej liczbie bakterii.

Wszelkie zalety, wady i potencjalne wady wybranej metody, cytometrii przepływowej zostały opisane w opublikowanym artykule [141]. Opisano w nim przewagi wynikające z wykorzystania tejże metody względem konwencjonalnych metod zliczania kolonii bakterii. Metoda cytometrii przepływowej pozwala na maksymalne zminimalizowanie możliwych szumów, niepewności pomiarowych i błędów, które mogą wpłynąć na wynik.

#### 3.1.2.4 Analiza eksperymentów filtracji krzyżowej wraz z modelowaniem matematycznym

Wpływ obecności substancji aktywnej o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych – karwakrolu – na filtrację w przepływie krzyżowym zbadano z użyciem zawiesiny *S. aureus* ATCC 29213 o wartości ok.  $1-2 \cdot 10^8$  CFU / mL (co opisano w rozdziale 2.3.2). Eksperymenty przeprowadzono z membranami zawierającymi 0 – 25% karwakrolu. Spadek natężenia przepływu permeatu z powodu fizycznego osadzania się bakterii podczas filtracji przedstawiono na Rysunku 3.21. Jak widać, membrany z octanu celulozy z ładunkiem 20% i 25% karwakrolu umożliwiły uzyskanie najwyższego strumienia permeatu. Wyniki pokazane na Rysunku 3.21 są zgodne z wynikami analizy cytometrii przepływowej (Rysunek 3.19). Im większe osadzanie się bakterii na membranie, tym większy spadek strumienia permeatu. Liczba komórek osadzonych na niezaimpregnowanej membranie była najwyższa, co doprowadziło do najbardziej

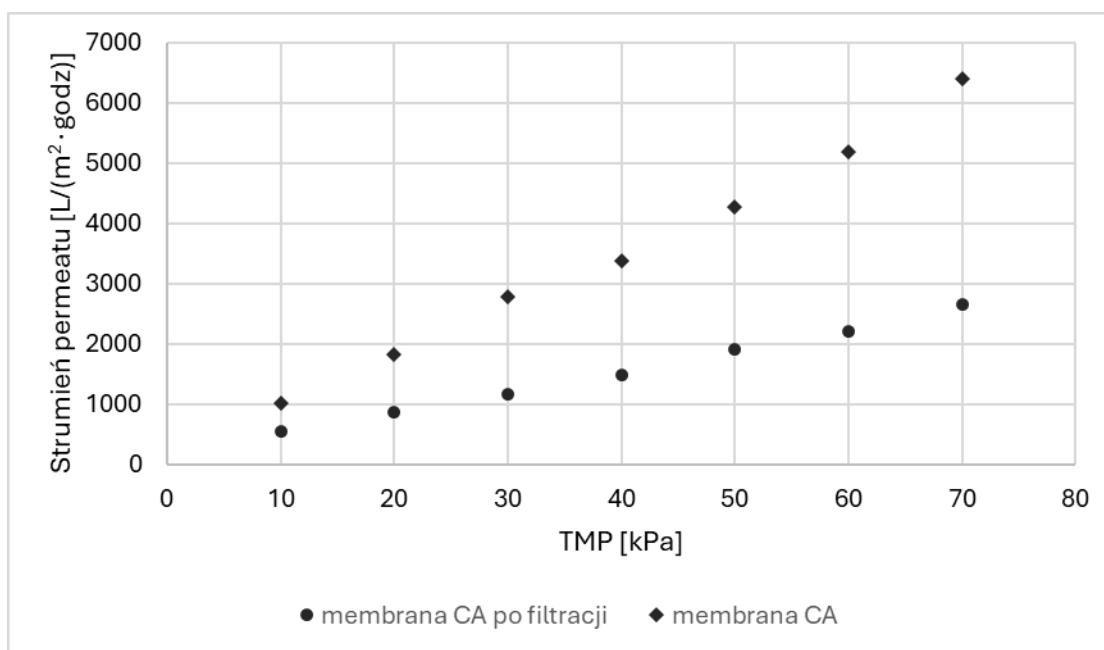
znaczącego spadku strumienia permeatu. Membrany z 20 i 25% karwakrolem wykazały najniższą depozycję bakterii na powierzchni membrany, a zatem największe strumienie permeatu w trakcie filtracji krzyżowej.



Rysunek 3. 21 Spadek strumienia permeatu w systemie filtracji krzyżowej zawiesiny *S. aureus*.

W naszej pracy [140] przedstawiono pomiary potencjału Zeta przedstawione na Rysunku 3.18. Wyniki te wykazały najwyższy ujemny ładunek membran dla załadunku 25 i 30% karwakrolem. Potencjał Zeta szczepu *S. aureus* jest znany z literatury [172] i jest również ujemny (- 35,6 mV). Dlatego zwiększony ładunek ujemny membrany z 25% załadunkiem karwakrolem potwierdzał jego właściwości antyadhezyjne. Jednak membrana z 20% załadunkiem karwakrolem również wykazywała doskonałe właściwości antyadhezyjne, chociaż jej ładunek ujemny był najmniejszy spośród badanych membran. Dlatego można stwierdzić, że wszystkie membrany wykazywały ładunek ujemny wspierający ich działanie antyadhezyjne i że zaobserwowana różnica nie jest decydująca dla aktywności antybiofilmowej.

Wpływ ciśnienia transmembranowego (TMP) na strumień permeatu przez niezmodyfikowaną membranę ze zdeponowanymi bakteriami (po 30 minutach filtracji krzyżowej) przeprowadzono w celu zbadania ściśliwości placka bakteryjnego. Wyniki przedstawione na Rysunku 3.22 dla membrany po 30 minutach filtracji krzyżowej wykazały liniową zależność pomiędzy strumieniem permeatu i TMP (linia prosta), co sugeruje, że opór placka bakteryjnego nie zmienia się wraz ze zmianą TMP w badanym zakresie. W związku z tym warstwę osadzonych bakterii można uznać za nieściśliwą.



Rysunek 3. 22 Strumień permeatu wody przez membranę z octanu celulozy (0% karwakrolu) przed i po 30 minutach filtracji krzyżowej (TMP 55 kPa) w funkcji ciśnienia transmembranowego (TMP)

Do modelowania spadku natężenia przepływu permeatu zastosowano równania dla różnych mechanizmów blokujących (Tabela 2.2). Równanie dla modelu filtracji plackowej ( $n = 0$ ) zostało rozwiązane numerycznie. Aby porównać dopasowanie tych czterech przypadków do danych, wybrano współczynnik determinacji  $R^2$ , chociaż w przypadku modeli nieliniowych może to być czasami niewłaściwa miara [173]. Jednak w naszym przypadku wszystkie modele zawierają tę samą liczbę parametrów dopasowania, tj. trzy. Zatem jeśli porównamy modele dla tej samej filtracji membranowej, to nie ma znaczenia, czy wybierzemy  $R^2$ , czy regresję sumy kwadratów (SSR) ze względu na ich zależność:

$$R^2 = 1 - \frac{SSR}{TSS} \quad (3.3)$$

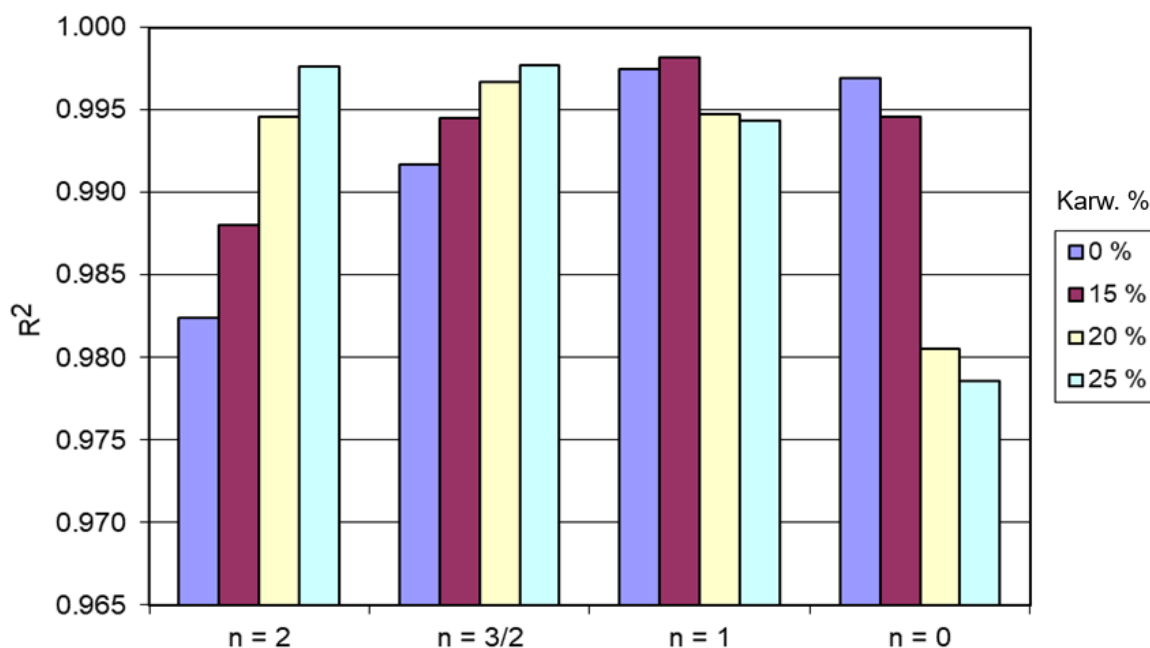
gdzie TSS jest sumą wszystkich kwadratów (*ang. Total sum of squares*) zdefiniowanych jako:

$$TSS = \sum_i (J_{i,exp} - J_{av,exp})^2 \quad (3.4),$$

gdzie  $J_{av,exp}$  jest średnią arytmetyczną wszystkich  $J_{i,exp}$ , ustaloną eksperymentalnie.



Podczas porównywania jednego modelu blokowania dla różnych rodzajów filtracji membranowych może wystąpić problem z powodu możliwych różnic w TSS. Jednakże w przypadku naszych danych eksperymentalnych TSS nie różni się znacząco (dla 0%, 15%, 20% i 25%,  $TSS \cdot 10^6$  wynosi odpowiednio 0,98, 1,04, 1,18 i 1,18). Zatem wybór  $R^2$  jako miary dopasowania jest uzasadniony. Rysunek 3.23 przedstawia  $R^2$  dla czterech modeli blokowania i czterech zawartości karwakrołu (0-25%).



Rysunek 3. 23  $R^2$  dla wszystkich modeli blokujących i czterech typów membran.

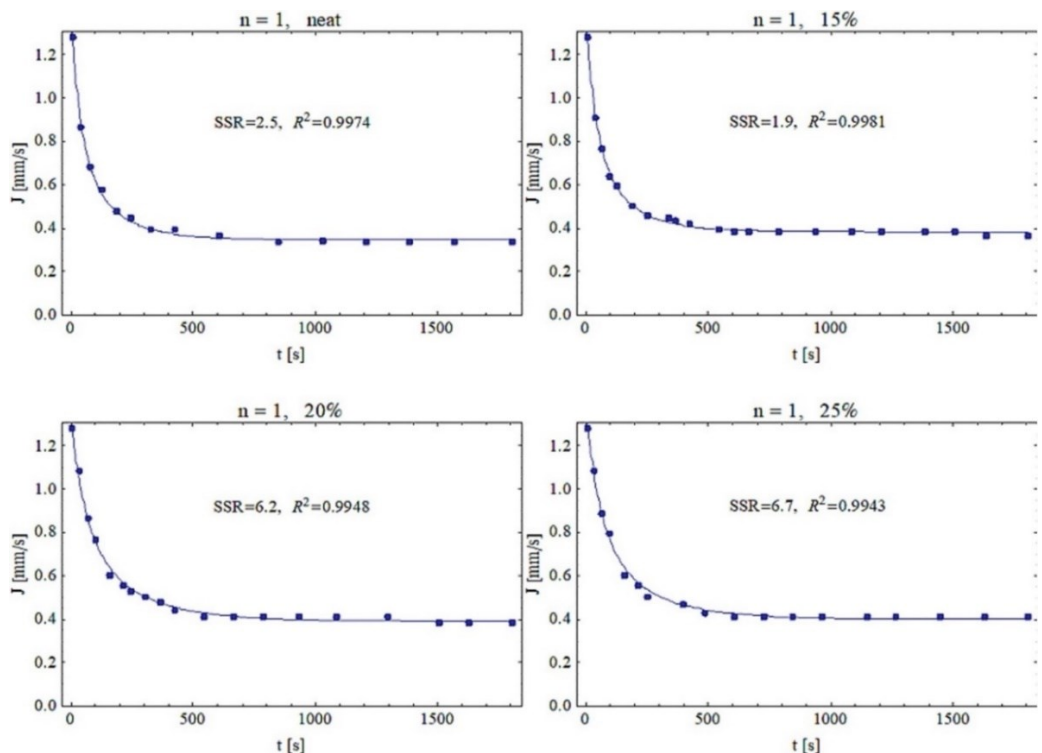
Wyniki pokazują, że w przypadku największej depozycji bakterii, tj. w przypadku niezaimpregnowanej membrany (całkowita liczba wykrytych komórek  $4,92 \cdot 10^7 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ) mechanizmem odpowiedzialnym za blokowanie był pośrednie blokowanie ( $n = 1$ ;  $R^2 = 0,9974$ ) i filtracja plackowa ( $n = 0$ ;  $R^2 = 0,9969$ ). Model pośredniego blokowania zakłada, że każda cząstka może osadzić się na innej cząstce już osadzonej i zablokować niektóre pory lub bezpośrednio zablokować niektóre obszary membrany (Rysunek 1.1c). Zjawisko filtracji plackowej zakłada, że każda cząsteczka lokuje się na innych, które już były zdeponowane na powierzchni membrany i zablokowały niektóre pory (Rysunek 1.1d), więc nie ma miejsca na powierzchni membrany na depozycję dla nowych cząstek bakterii [24]. Stwierdzenie występowania filtracji plackowej potwierdzają wyniki cytometrii przepływowej, które wykazały największe osadzanie się bakterii na niezmodyfikowanej membranie. W membranie zawierającej 15% karwakrołu (całkowita liczba wykrytych komórek  $2,71 \cdot 10^6 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ) wyniki modelowania wskazały na dominujący mechanizm pośredniego blokowania membrany ( $n = 1$ ;  $R^2 = 0,9981$ ). Membrany z najmniejszą zdeponowaną ilością bakterii to zaimpregnowane w 20% karwakrolem (ogólna liczba wykrytych komórek  $3,65 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ) i 25% załadunkiem karwakrołu (ogólna liczba wykrytych komórek  $4,29 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL})$ ). Modelowanie matematyczne wykazało dla obu przypadków dominujący mechanizm standardowego blokowania ( $n = 1,5$ ;

$R^2(20\%) = 0,9967$ ;  $R^2(25\%) = 0,9977$ ) i całkowitego blokowania ( $n = 2$ ;  $R^2(25\%) = 0,9977$ ). Dla obu tych membran zjawisko filtracji plackowej było najmniej wyraźne.

Wyniki dopasowania  $R^2$  funkcji przedstawionych w Tabeli 2.2 dla mechanizmów blokowania membrany: całkowitego, standardowego i pośredniego przy pomocy wtyczki Curve Fitter dostępnej w oprogramowaniu Matlab R2023a przedstawiono w załączniku na Rysunku Z.4.

Modelowanie w programie Matlab potwierdza wyniki uzyskane w programie Mathematica, a przedstawione na Rysunku 3.23. W przypadku membrany niezaimpregnowanej również jest widoczne pośrednie blokowanie membrany. Analogicznie blokowanie całkowite i standardowe jest dominujące dla membran zaimpregnowanych w 20% i 25%.

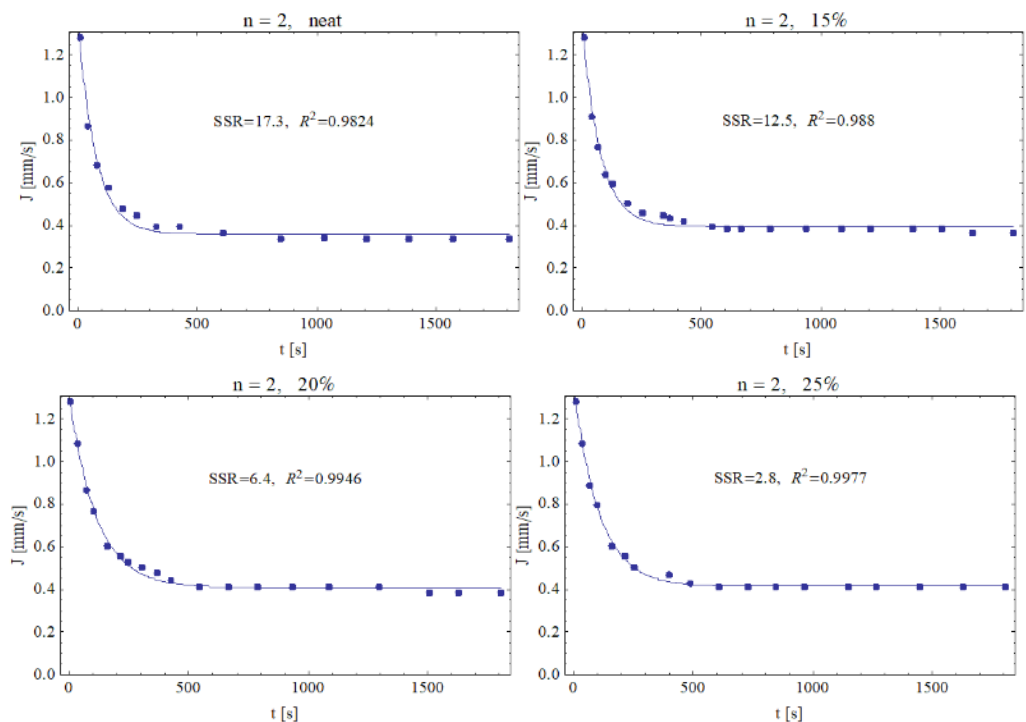
Mechanizm całkowitego blokowania ( $n=2$ ) – wykrywany jako dominujący mechanizm w membranie o najwyższej zawartości karwakrolu (25%) – zakłada, że każda cząstka docierająca do membrany uczestniczy w blokowaniu jakiegoś poru lub porów bez zjawiska nakładania się cząstek, co pokazano na Rysunku 1.1a. Standardowy model blokowania wskazuje na zjawisko osadzania cząstek na ścianach porów (Rysunek 1.1b) [24]. Wskazanie standardowego blokowania jako obecnego mechanizmu w membranach zawierających 20% i 25% karwakrolu może wynikać z dużego odsetka martwych komórek (odpowiednio około 30% i 42%). Można stwierdzić, że wraz ze wzrostem zawartości karwakrolu w membranach następuje zmiana mechanizmu blokowania z filtracji plackowej poprzez blokowanie pośrednie w stronę blokowania całkowitego i standardowego. Wynik ten potwierdza analiza cytometrii przepływowej, która wykazała zmniejszenie liczby osadzających się bakterii wraz ze wzrostem zawartości karwakrolu w membranach. Ogólnie rzecz biorąc, biorąc pod uwagę wszystkie typy membran, zbiorczo najlepsze wyniki dał pośredni model blokowania ( $n = 1$ ). Porównanie wyników eksperymentalnych i modelowych z wykorzystaniem pośredniego modelu blokowania ( $n = 1$ ) pokazano na Rysunku 3.24.



Rysunek 3. 24 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu *S. aureus* do modelu blokowania pośredniego; SSR wyraża się w [ $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2$ ]; (● – wartości doświadczalne)

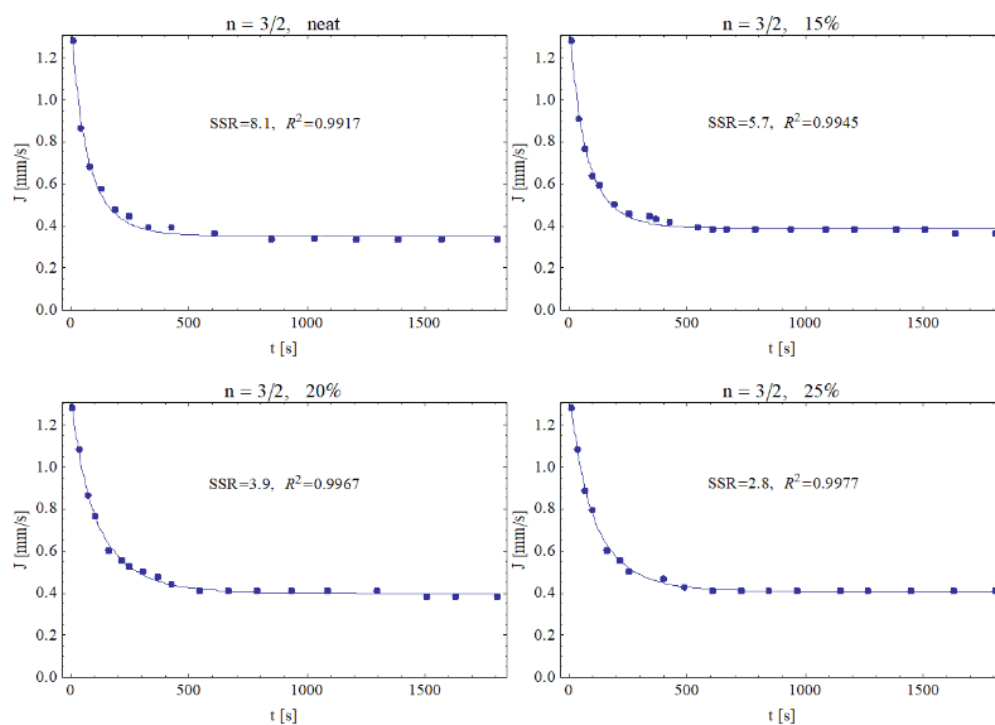
Wyniki dopasowania dla pozostałych modeli blokowania przedstawiono poniżej na Rysunku 3.25-27.

**n = 2**



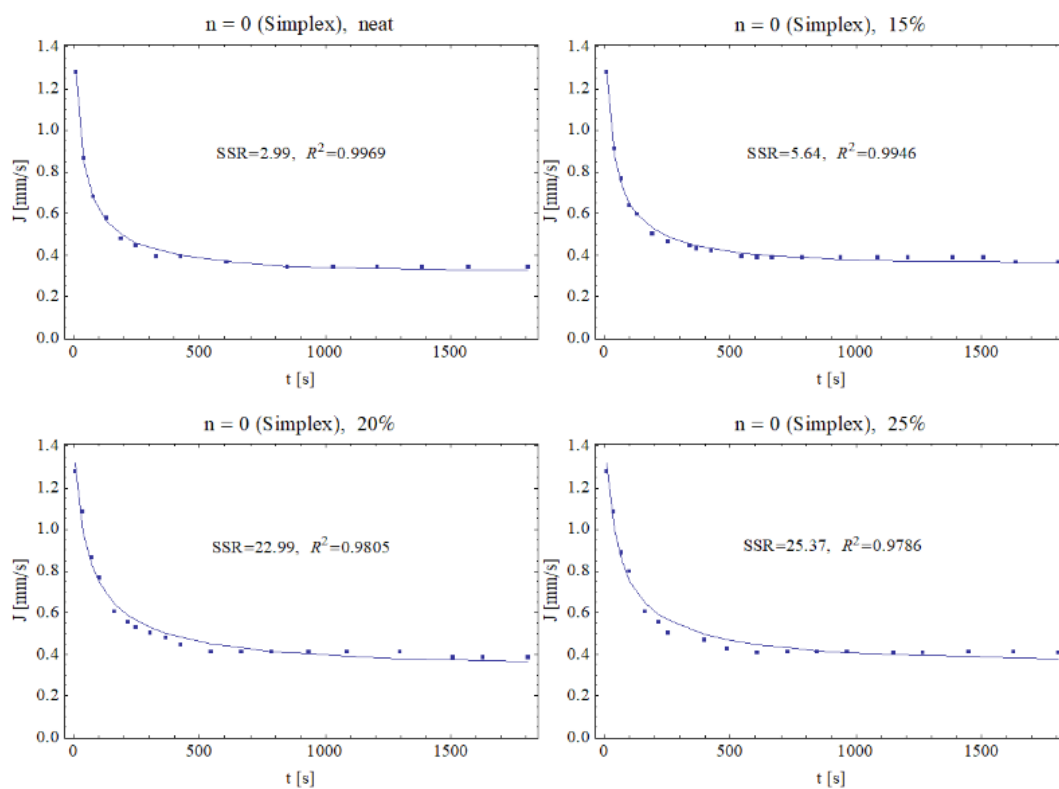
Rysunek 3. 25 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu *S. aureus* do modelu całkowitego blokowania; SSR wyraża się w [ $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2$ ]; (● – wartości doświadczalne)

**n = 3/2**



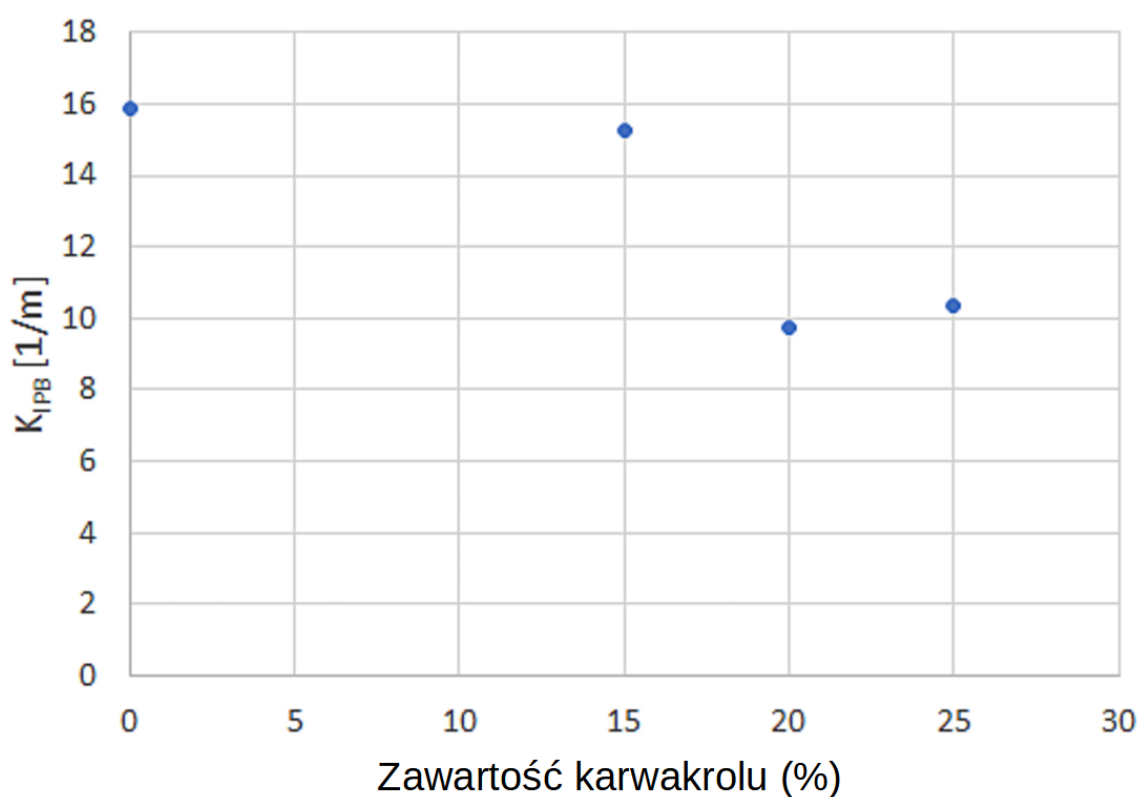
Rysunek 3. 26 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu *S. aureus* do modelu standardowego blokowania; SSR wyraża się w  $[10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2]$ ; (● – wartości doświadczalne)

**n = 0**



Rysunek 3. 27 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu *S. aureus* do modelu filtracji plackowej; SSR wyraża się w  $[10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2]$ ; (● – wartości doświadczalne)

Dla modelu pośredniego blokowania ( $n = 1$ ) oszacowano wartości  $K_{IPB}$  dla każdego badanego typu membrany. Uzyskane wartości  $K_{IPB}$  w drodze modelowania matematycznego przedstawiono na Rysunku 3.28.  $K_{IPB}$  jest współczynnikiem powierzchniowym opisującym zablokowaną powierzchnię membrany na jednostkę całkowitej objętości permeatu. Uzyskane wartości  $K_{IPB}$  pozwalają stwierdzić, że obecność karwakrolu w strukturze membrany zmniejszyła liczbę zablokowanych porów. Najniższe wartości parametru  $K_{IPB}$  wyniosły 9,7 i 10,4 dla membran zawierających odpowiednio 20% i 25% karwakrolu. Najwyższa wartość  $K_{IPB}$  wyniosła 15,9 dla membrany niezaimpregnowanej, tj. niezawierającej karwakrolu. Dodatkowo należy podkreślić, iż analiza Rysunku 3.25 ukazuje, że  $J^*$ , czyli strumień w stanie ustalonym dla  $t \rightarrow \infty$ , nieznacznie wzrasta wraz z zawartością karwakrolu. Wzrost ten widoczny jest dla membrany niezaimpregnowanej do membrany zaimpregnowanej w 25% od kolejno 0,34 mm/s do 0,40 mm/s.



Rysunek 3. 28 Współczynnik powierzchniowy  $K_{IPB}$  uzyskany poprzez modelowanie pośredniego mechanizmu blokującego dla różnych ładunków karwakrolu w membranach.

Wartości parametru  $K_{IPB}$  zostały uzyskane również przy pomocy modelowania matematycznego w programie Matlab R2023a wtyczką Curve Fitter. Wykres zależności między wartością współczynnika powierzchniowego  $K_{IPB}$  a załadunkiem karwakrolu dla mechanizmu blokowania pośredniego wykorzystując wtyczkę Curve Fitter przedstawiono w załączniku na Rysunku Z.5. Najwyższa wartość, tj. 14,2 została uzyskana dla membrany niezaimpregnowanej, zaś najniższa 9,0 dla membrany zaimpregnowanej w 25%. Zmiany wartości dla obu wykresów na Rysunkach 3.28 i Z.5 są bardzo podobne,

więc dodatkowe modelowanie w programie Matlab potwierdziło, że obecność karwakrołu w strukturze membrany zmniejszyła liczbę zablokowanych porów.

### 3.1.3 Wnioski z badań dotyczących impregnacji nadkrytycznej

Wykazano możliwość modyfikacji komercyjnych membran mikrofiltracyjnych z poliamidu i z octanu celulozy w procesie impregnacji nadkrytycznej karwakrolem. Modyfikację prowadzono w 40°C oraz w zakresie 10, 15 i 20 MPa dla membran z poliamidu oraz 15, 20 MPa dla membran z octanu celulozy.

Wyniki kinetyki impregnacji wskazują, że im wyższe ciśnienie, tym wyższy załadunek karwakrołu. Rezultaty dla obu materiałów wykazują, że najszybsza impregnacja następuje w pierwszych 30 minutach. Załadunek do poliamidu wynoszący 41,3% uzyskano po 6 godzinach przy ciśnieniu 20 MPa. Uzyskanie 25% załadunku karwakrołu do octanu celulozy i poliamidu możliwe jest już po 2 godzinach przy 40°C i 20 MPa. Załadunek do octanu celulozy wynoszący 30,7% uzyskano po 2 godzinach przy ciśnieniu 20 MPa. Wyższy załadunek karwakrołu jest możliwy przez wydłużenie czasu impregnacji, lecz skutkuje on pęcznieniem struktury octanu celulozy.

Zdjęcia powierzchni i przekrojów, dzięki metodzie SEM/FIB świadczą, iż zmodyfikowane membrany zachowały porowatą strukturę materiału po impregnacji karwakrolem. Pęcznienie było obserwowalne w próbce z 30% załadunkiem do membran z octanu celulozy i poliamidu.

Eksperymenty filtracji krzyżowej membrany poliamidowej wskazywały, że pomimo pęcznienia spowodowanego impregnacją, właściwości funkcjonalne membrany nie zostały znacząco naruszone. Membrana poliamidowa zaimpregnowana w 43% nadal zachowywała funkcjonalność w modelu klatki piersiowej.

Wykorzystanie zaimpregnowanej karwakrolem membrany poliamidowej jako filtra antybakteryjnego w modelu klatki piersiowej pozwoliło na obniżenie zanieczyszczenia bakteryjnego o kolejne 27% względem standardowej procedury wdmuchiwania ditlenku węgla.

Eksperymenty filtracji krzyżowej udowodniły, że membrana z octanu celulozy zaimpregnowana w 20% i 25% karwakrolem wykazywała najwyższy strumień permeatu w testach filtracji krzyżowej.

Badanie cytometrii przepływowej wykazało, że obecność karwakrołu w membranie z octanu celulozy znacząco obniża liczbę osadzonych bakterii względem membrany niezaimpregnowanej. Membrana niezaimpregnowana po 30 min filtracji krzyżowej miała największą liczbę wykrytych komórek bakterii (ogólna liczba wykrytych komórek  $4,92 \cdot 10^7 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL}_{\text{permeat}})$  zaś membrany zawierające 20% karwakrołu miały całkowitą liczbę wykrytych komórek  $3,65 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL}_{\text{permeat}}$ , natomiast membrana zawierająca 25% karwakrołu wykazała całkowitą liczbę wykrytych komórek  $4,29 \cdot 10^5 / (\text{cm}^2 \cdot \text{mL}_{\text{permeat}}$ . Membrany z octanu celulozy zaimpregnowane w 20% i 25% wykazały największy odsetek martwych bakterii, odpowiednio

30% i 42%. Jednocześnie membrany zaimpregnowane w 20% i 25% wykazywały najmniejszy spadek strumienia permeatu w testach filtracji krzyżowej.

Modelowanie matematyczne wykazało zmianę sposobu zdeponowania bakterii w procesie filtracji krzyżowej z użyciem zmodyfikowanych membran z octanu celulozy. Zmiana następowała od modelu filtracji plackowej dla niezmodyfikowanej membrany po – wraz ze wzrostem załadunku karwakrolu – model blokowania bezpośredniego, standardowego i całkowitego, który wykluczał depozycję cząstek na innych cząstkach. Wyniki te udowadniają, że zmiana modelu blokowania jest zależna od załadunku substancji aktywnej.

Metoda impregnacji nadkrytycznej pozwala na produkcję zmodyfikowanych membran przy braku produkcji odpadów. W procesie tym nie wykorzystywano niebezpiecznych substancji organicznych. Po skończonym procesie impregnacji nadkrytycznej otrzymuje się gotowy produkt, a dalsze procesy obróbki nie są potrzebne.

Ze względu na dużą lotność karwakrolu i jego uwalnianie ze struktury membrany zaleca się przechowywać zaimpregnowany produkt w szczelnych opakowaniach, jak np. jednorazowe chusteczki do okularów.

## 3.2 Szczepienie w fazie nadkrytycznej

### 3.2.1 Synteza czwartorzędowych związków amoniowych

Zsyntetyzowano trzy czwartorzędowe związki amoniowe (*ang. quaternary ammonium compounds*, w skrócie QAC), które scharakteryzowano z wykorzystaniem metod NMR i FTIR. Wzory strukturalne uzyskanych związków zostały przedstawione w Tabeli 2.4. Według naszej wiedzy jedyne doniesienie literaturowe na temat syntezy tych związków przedstawia zespół Xu i in.[101] W dostępnej literaturze brak jest danych na temat aktywności biologicznej tych konkretnych QAC lub ich zastosowania w projektowaniu materiałów. Procedura syntezy trzech QAC została opisana w Rozdziale 2.4.1. Zawarto w nim opis wyników badań NMR  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  otrzymanych związków chemicznych.

QAC 1 zsyntetyzowano z wydajnością 80,8%. Xu i in.[101] podali wydajność na poziomie 57,7%. Widma NMR  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  i FTIR QAC 1 przedstawiono odpowiednio na Rysunku Z.68 w załączniku.

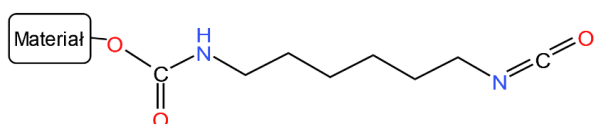
QAC 2 zsyntetyzowano z wydajnością 99,0%. Xu i in. [101] podali wydajność na poziomie 95%. Widma NMR  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  i FTIR QAC 2 przedstawiono odpowiednio na Rysunku Z.911w załączniku.

QAC 3 zsyntetyzowano z wydajnością 97,9%. Xu i in. [101] podali wydajność na poziomie 98,7%. Widma NMR  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  i FTIR QAC 3 przedstawiono odpowiednio na Rysunku Z.12-14 w załączniku.

### 3.2.2 Szczepienie w fazie nadkrytycznej

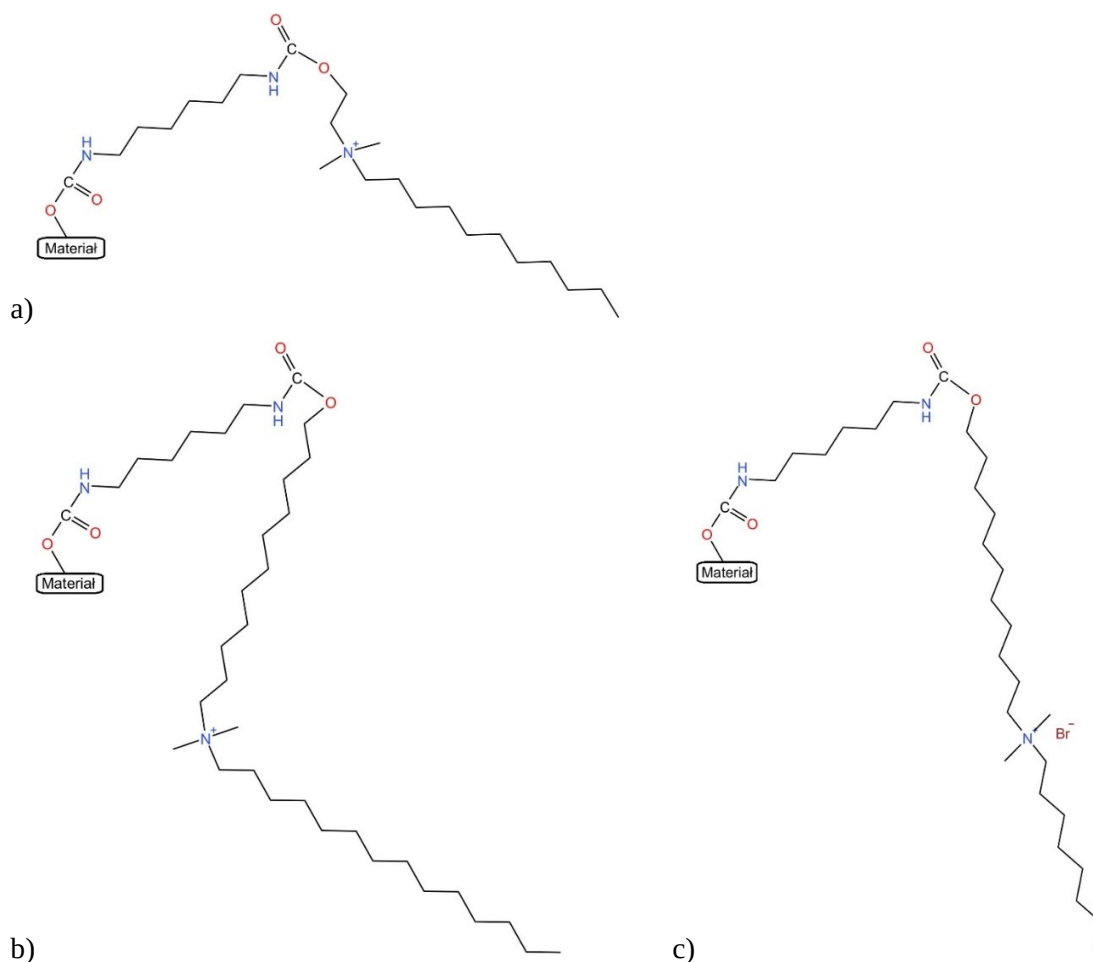
Reakcję szczepienia w fazie nadkrytycznej przeprowadzono w warunkach ciśnienia 30 MPa oraz temperatury 70°C. Warunki te zastosowano dla obu materiałów (octanu celulozy oraz blendu skrobiowo-chitozanowego), jak i obu kroków modyfikacji, tj.: pierwszy jako reakcji przyłączenia łącznika - „linkera” diizocyjanianu heksametylenu (HDI) do grup hydroksylowych materiału, drugi jako przyłączenie QAC do grupy funkcyjnej linkera. Schemat reakcji szczepienia nadkrytycznego ukazano na Rysunku 2.10.

Rysunek 3.29 przedstawia wzór strukturalny materiału uzyskanego po pierwszym kroku modyfikacji.



Rysunek 3. 29 Materiał (octan celulozy lub blend skrobiowo-chitozanowy) z zaszczipionym linkerem do grupy hydroksylowej materiału

Wzory strukturalne uzyskanych materiałów po zaszczipieniu QAC 1, QAC 2 i QAC 3 zaprezentowano na Rysunku 3.30.



Rysunek 3. 30 Wzory strukturalne uzyskanych materiałów po przyłączeniu do linkera HDI: a) QAC 1, b) QAC 2, c) QAC 3

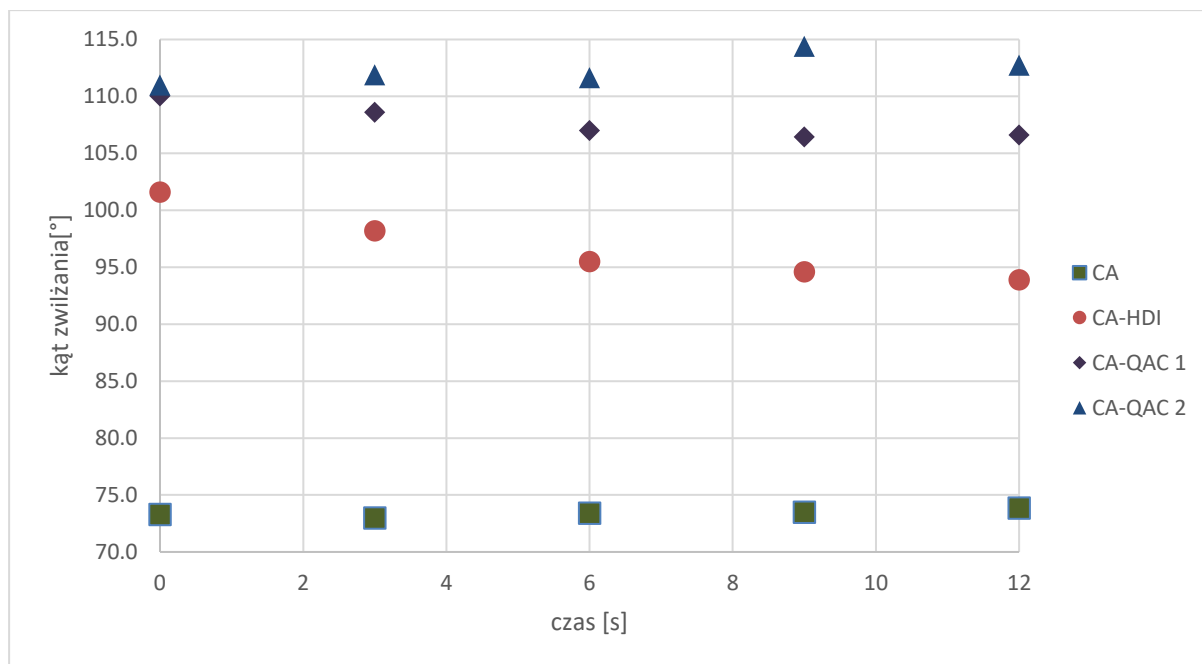


Zespół Xu i in. modyfikował w swej pracy suche drewno sosnowe o masie 1,40 g. W drugim etapie modyfikował 0,85 g zaszczipionego HDI drewna sosnowego. Warunki procesowe obu etapów ichniej reakcji to 100°C oraz 41,4 MPa, natomiast czas reakcji wynosił 20 godzin. W naszym przypadku w typowym eksperymencie modyfikowano 0,6 g octanu celulozy lub 0,02 g blendu skrobiowo-chitozanowego. Dla obu materiałów i dla obu etapów reakcji warunki procesowe to 70°C oraz 30 MPa. Czas reakcji obu etapów reakcji zależał od modyfikowanego materiału, tj.: 6 godzin dla modyfikacji octanu celulozy oraz 4 godziny dla modyfikacji blendów polimerowych.

### 3.2.3 Szczepienie w fazie nadkrytycznej octanu celulozy i charakteryzacja otrzymanych materiałów

Wykonano 19 eksperymentów szczepienia nadkrytycznego octanu celulozy, które wykazały, że przyłączenie linkera HDI zwiększa masę octanu celulozy w zakresie 10-13%. Badania przeprowadzone przez Xu i in. wykazały, że szczepienie nadkrytyczne linkera HDI do drewna iglastego skutkowało zwiększeniem masy drewna o 30% [[101].

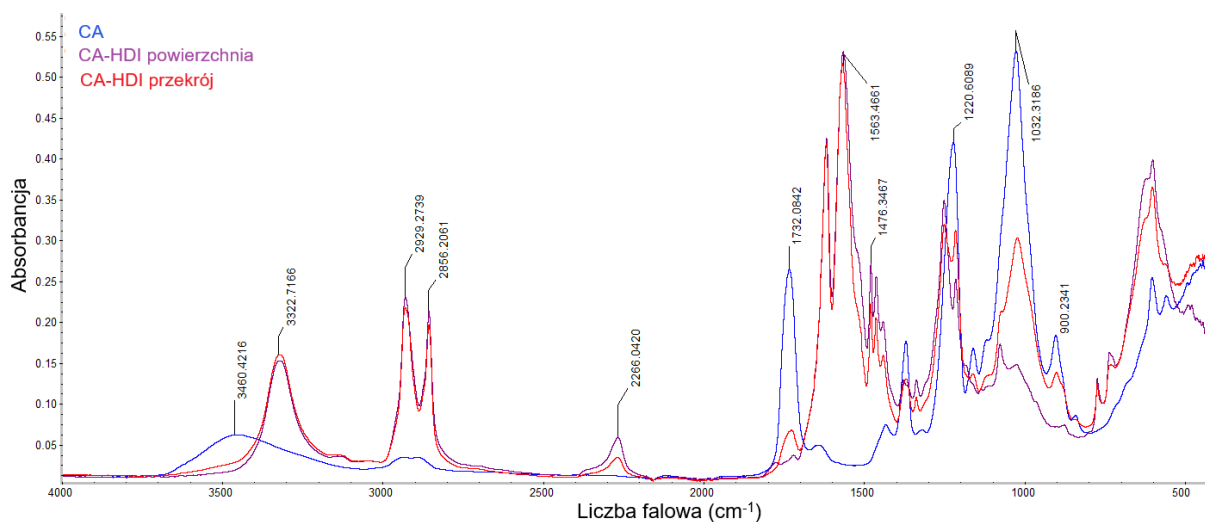
Pomiary kąta zwilżania wykonano zgodnie z opisem w Rozdziale 2.5. Badania wykonano na membranach z octanu celulozy wytwarzanych metodą „solvent casting”. Procedura produkcji membran nieporowatych z octanu celulozy została opisana w Rozdziale 2.4.2. Badaniu zwilżalności poddano również membrany zmodyfikowane metodą szczepienia nadkrytycznego linkerem HDI oraz QAC. Wyniki przedstawione na Rysunku 3.31 wykazały zwiększoną hydrofobowość membran CA szczepionych linkerem w porównaniu z niezmodyfikowaną membraną z octanu celulozy. Niezmodyfikowana membrana z octanu celulozy wykazała kąt zwilżania z kroplą wody średnio 73,4°. Po zaszczipieniu linkerem HDI wartość kąta zwilżania wzrosła do średnio 96,8°.



Rysunek 3. 31 Kąt zwilżania w funkcji czasu dla niezmodyfikowanej membrany z octanu celulozy (CA), membran CA szczepionych linkerem (CA-HDI) i membran po szczepieniu czwartorzędowymi związkami amoniowymi (QAC) (CA-QAC 1 i CA-QAC 2).

Po drugim kroku – tj. szczepieniu QAC masa zaszczepionego octanu celulozy zmniejszyła się o 2,8%. W artykule Xu i in. [101] zaraportowano zmniejszenie masy o 1,18% po zaszczepieniu QAC do materiału. Zaszczepienie QAC do materiału spowodowało wzrost kąta zwilżania do średnio 107,7° (CA-QAC 1) i 112,3° (CA-QAC 2). Pomiary kąta zwilżania szczepionych QAC membran z octanu celulozy wykazały znaczny wzrost hydrofobowości w porównaniu z niezmodyfikowaną membraną CA oraz z CA zaszczepioną linkerem HDI. Zdjęcia kropli wody na powierzchni membran z octanu celulozy niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych w czasie 12 sekund przedstawiono w Tabeli Z.1 w załączniku.

Aby potwierdzić reakcję przyłączenia linkera HDI i QAC do zmodyfikowanego materiału (jak pokazano na Rysunku 2.10), zastosowano analizę metodą FTIR. Na Rysunku 3.23 przedstawiono widma FTIR kulek z octanu celulozy: niezmodyfikowanej powierzchni, powierzchni oraz wnętrza zaszczepionego linkerem HDI. Schemat reakcji szczepienia linkera HDI do struktury materiału został przedstawiony na Rysunku 2.10. Wzór strukturalny materiału zaszczepionego linkerem HDI przedstawiono na Rysunku 3.29.



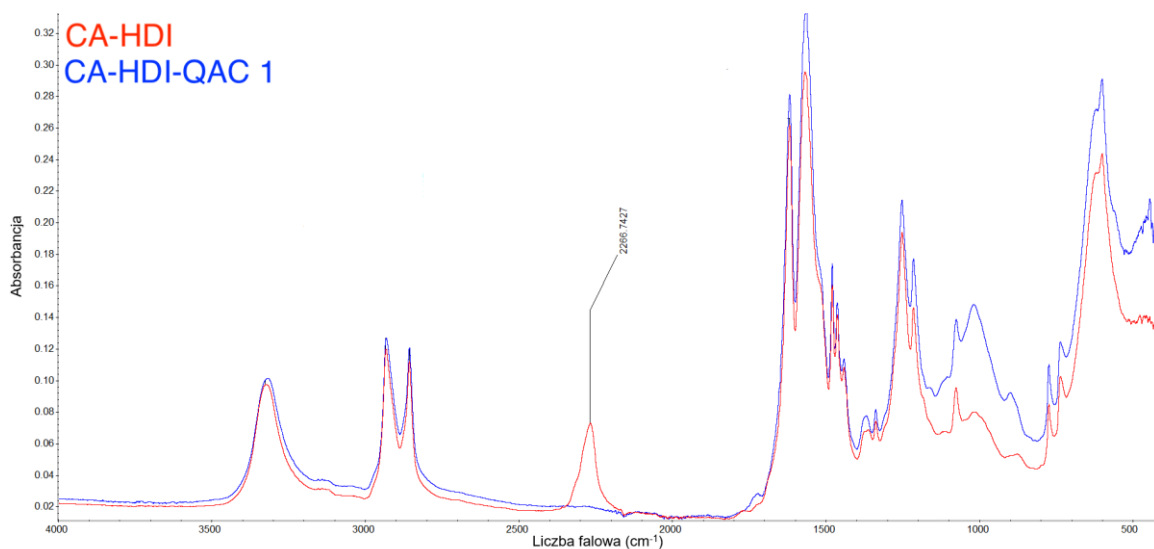
Rysunek 3. 32 Widma FTIR niezmodyfikowanych (CA) i szczepionych linkerem (CA-HDI) kulek octanu celulozy.

W widmie niezmodyfikowanej kulki CA widoczne są charakterystyczne piki octanu celulozy. Szerokie pasmo przy  $3460\text{ cm}^{-1}$  pochodzi z drgań rozciągających grupy hydroksylowej OH [174], [175]. Pik przy  $1732\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się drganiom rozciągającym grupy C=O [171], [175]. Pasma przy 1433, 1367 i  $1220\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się odpowiednio drganiom nożycowym, wahadłowemu i wachlarzowemu grupy CH [171], [167]. Pik przy  $1032\text{ cm}^{-1}$  jest przypisany grupie COC grupy glikozydowej, a pik przy  $900\text{ cm}^{-1}$  jest pasmem charakterystycznym dla sacharydu [164], [170], [171].

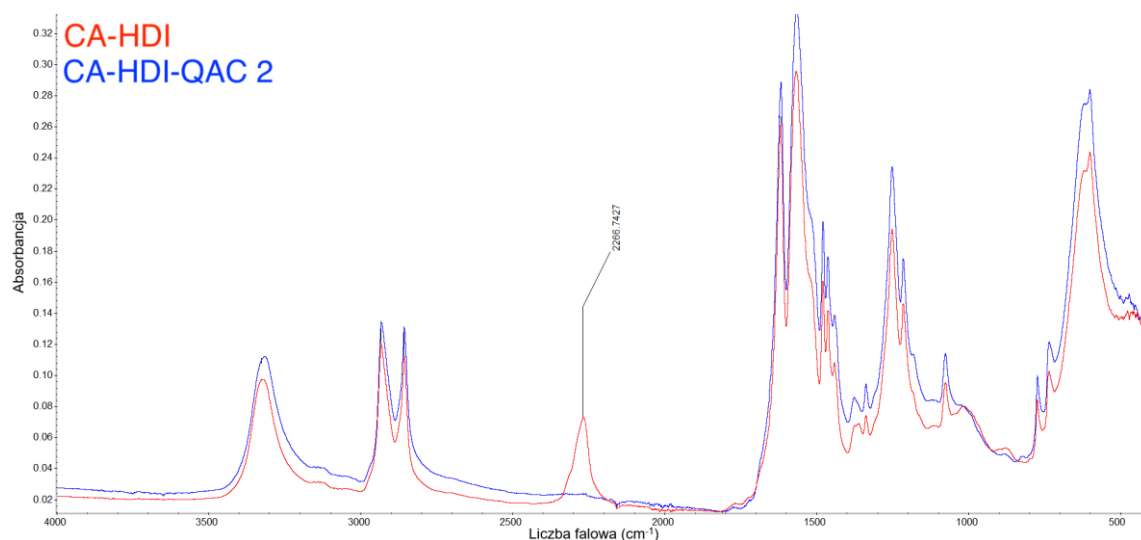
Przedstawione na Rysunku 3.23 widma powierzchni i przekroju kulek CA szczepionych linkerem HDI są podobne, co wskazuje, że reakcja szczepienia nadkrytycznego zachodziła w całej objętości modyfikowanego materiału. Jednym z dowodów wystąpienia reakcji chemicznej jest zanik grupy hydroksylowej OH ( $3460\text{ cm}^{-1}$ ) widocznego w widmie niezmodyfikowanego materiału i pojawienie się nowego pasma przy  $3322\text{ cm}^{-1}$ , które pochodzi od drgania rozciągającego grupy NH [101]. Nieprzereagowane grupy hydroksylowe również przynależą do pasma przy  $3322\text{ cm}^{-1}$  [101]. Nowe, charakterystyczne pasmo przy  $2266\text{ cm}^{-1}$  świadczy o pojawieniu się grupy izocyjanianowej, co dowodzi o zaszczepieniu linkera diizocyjanianowego do struktury materiału [101], [176].

Nowe pasma przy 1619 i  $1563\text{ cm}^{-1}$  pochodzą od drgań nożycowych NH, natomiast pasmo przy  $1354\text{ cm}^{-1}$  przypisane jest drganiom rozciągającym CN [176]. Pasma przy 2929 i  $2856\text{ cm}^{-1}$  należą do drgań asymetrycznego i symetrycznego rozciągania grupy CH, natomiast pasmo obserwowane przy  $1476\text{ cm}^{-1}$  należy do drgań nożycowych CH w materiale szczepionym HDI [101], [176], [177].

Rysunek 3.33 przedstawia widma porównawcze octanu celulozy zaimpregnowanego linkerem HDI oraz octanu celulozy zaszczepionego QAC 1 lub QAC 2. Schemat reakcji zaszczepienia QAC do struktury materiału z przyłączonym linkerem HDI przedstawiono na Rysunku 2.10. Wzory strukturalne materiałów uzyskanych po przyłączeniu QAC 1 i QAC 2 przedstawiono kolejno na Rysunku 3.30a i 3.30b.



a)



b)

Rysunek 3. 33 Widma FTIR octanu celulozy z porównaniem próbek zaszczipionych HDI i QAC 1 (a) oraz HDI i QAC 2 (b).

Widma wykazują całkowite przereagowanie grupy izocyjanianowej (zniknięcie piku przy  $2266\text{ cm}^{-1}$ ), co świadczy o udanym drugim etapie szczepienia ukazanim w Rysunku 2.10. Ponownie, szczepienie zachodziło w całej objętości polimeru, co przedstawiono w Załączniku na Rysunku Z.15.

Badano 4, 6 i 20 godzin jako czasy szczepienia nadkrytycznego dla obu etapów modyfikacji octanu celulozy. Wykazano, że minimalny czas potrzebny na przereagowanie grup hydroksylowych octanu celulozy i pojawienie się grupy izocyjanianowej świadczącej o sukcesie szczepienia w pierwszym kroku modyfikacji to 6 godzin. Podobnie 6 godzin było potrzebnych, by zaszczipić QAC do grupy izocyjanianowej. Skrócenie czasu reakcji do 4 godzin skutkowało nieprzereagowaniem w całości grup hydroksylowych w pierwszym etapie, natomiast w drugim grupa izocyjanianowa nadal była widoczna po szczepieniu. Zdecydowano zatem prowadzić wszystkie kolejne eksperymenty przez 6 godzin

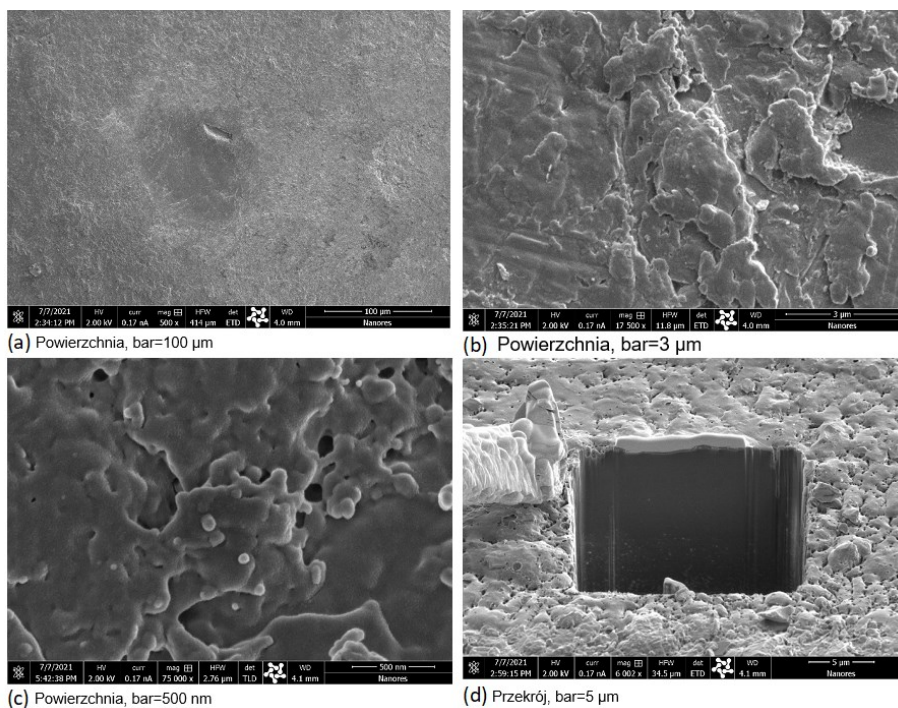
Zespół Zhou i in.[178] przeprowadził proces szczepienia blendu octanu celulozy i poliwinylpirolidonu (PVP), gdzie substancją aktywną był chlorek epoksypropylodimetylododecyloamoniowy w roztworze wodnym. Niestety autorzy nie przedstawili tej części widma FTIR, w której spodziewane jest pasmo absorpcji grupy hydroksylowej CA (około  $3460\text{ cm}^{-1}$ ). W związku z tym nie przedstawiono również potencjalnego jego zaniku w wyniku udanego szczepienia. Biorąc pod uwagę odmienny charakter chemiczny stosowanych QAC, widma z ich badań i naszych badań nie są porównywalne. Należy jednak zauważyć, że autorzy uzyskali po szczepieniu materiał bardziej hydrofilowy, gdy tymczasem w naszym badaniu otrzymano, materiał bardziej hydrofobowy.

### 3.2.3.1 Wpływ szczepienia nadkrytycznego na strukturę membran litych z octanu celulozy

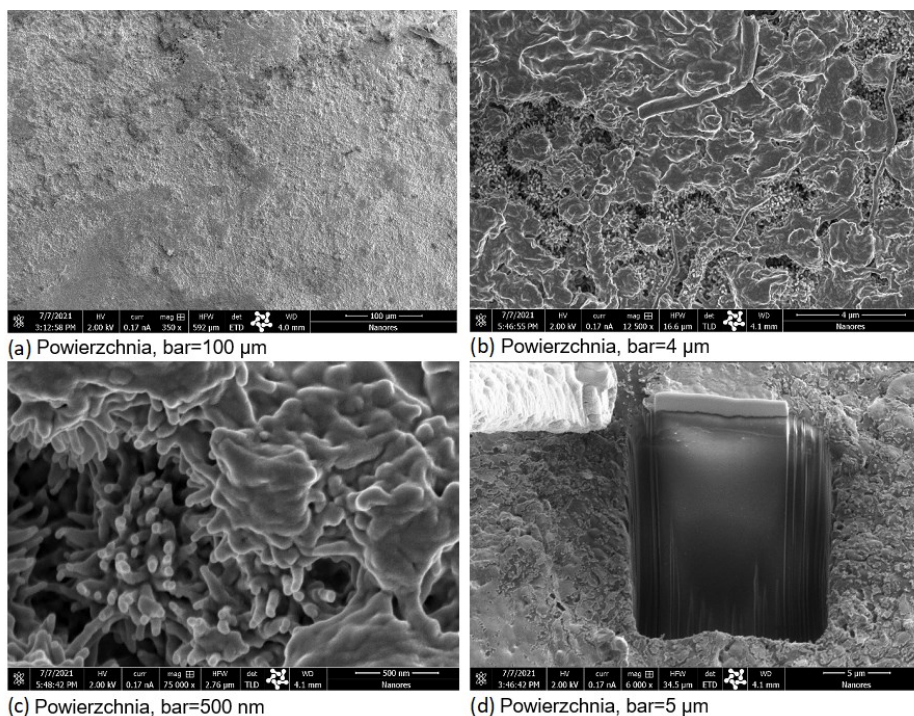
Wpływ szczepienia nadkrytycznego na strukturę octanu celulozy został zbadany przy pomocy mikroskopii elektronowej SEM-FIB. W ramach badań, poza badaną powierzchnią materiału przeprowadzono również badanie przekroju, stosując skupioną energetycznie wiązkę jonów galu, co umożliwiło wycięcie próbki podczas badania SEM.

Zdjęcia SEM powierzchni i przekroju niezmodyfikowanej kulki CA i kulki CA po przeszczepieniu łącznika zaprezentowano odpowiednio na Rysunku 3.34 i 3.35. Widoczna jest zmiana powierzchni badanej próbki po szczepieniu nadkrytycznym. Stała się ona mniej gładka z przypominającymi nitki wypustkami, co przedstawiono na Rysunku 3.35b oraz 3.35c. Chropowatość powierzchni powstała prawdopodobnie z braku wiązań wodorowych między łańcuchami polimerowymi. Grupy hydroksylowe struktury octanu celulozy są odpowiedzialne za międzycząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchami polimeru. Reakcja grup hydroksylowych w CA z linkerem (HDI) (Rysunek 2.10) spowodowała znaczne zmniejszenie liczby grup hydroksylowych dostępnych dla zapewnienia tej interakcji pomiędzy łańcuchami polimeru i przyczyniła się do zaobserwowanej zmiany wyglądu powierzchni.

Zdjęcie (Rysunek 3.35d) przekroju poprzecznego próbki CA szczepionej linkerem HDI ujawniła, że próbka zachowała swoją litą (zwartą) strukturę, mimo że – jak wykazano analizą FTIR na Rysunku 3.32 - modyfikacja nastąpiła w całej jej objętości.



Rysunek 3. 34 Zdjęcia SEM-FIB niezmodyfikowanych kulek z octanu celulozy (CA): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d).

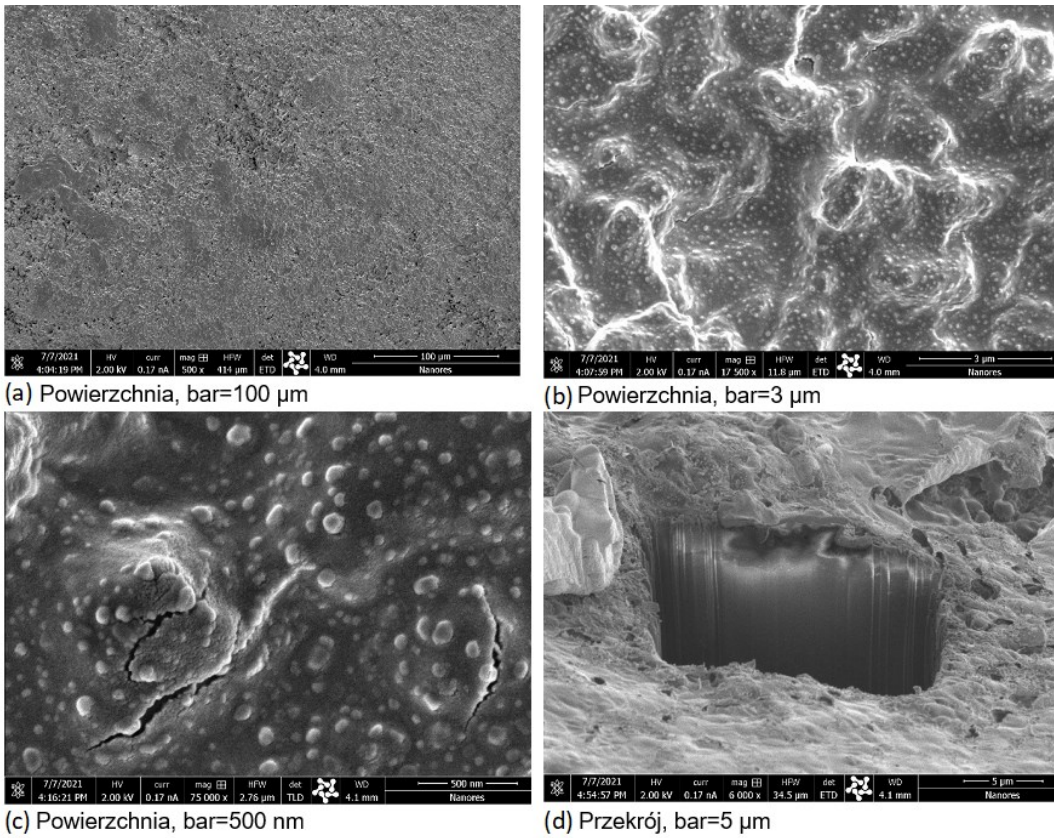


Rysunek 3. 35 Zdjęcia SEM-FIB kulek z octanu celulozy szczepionych linkerem (CA-HDI): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d).

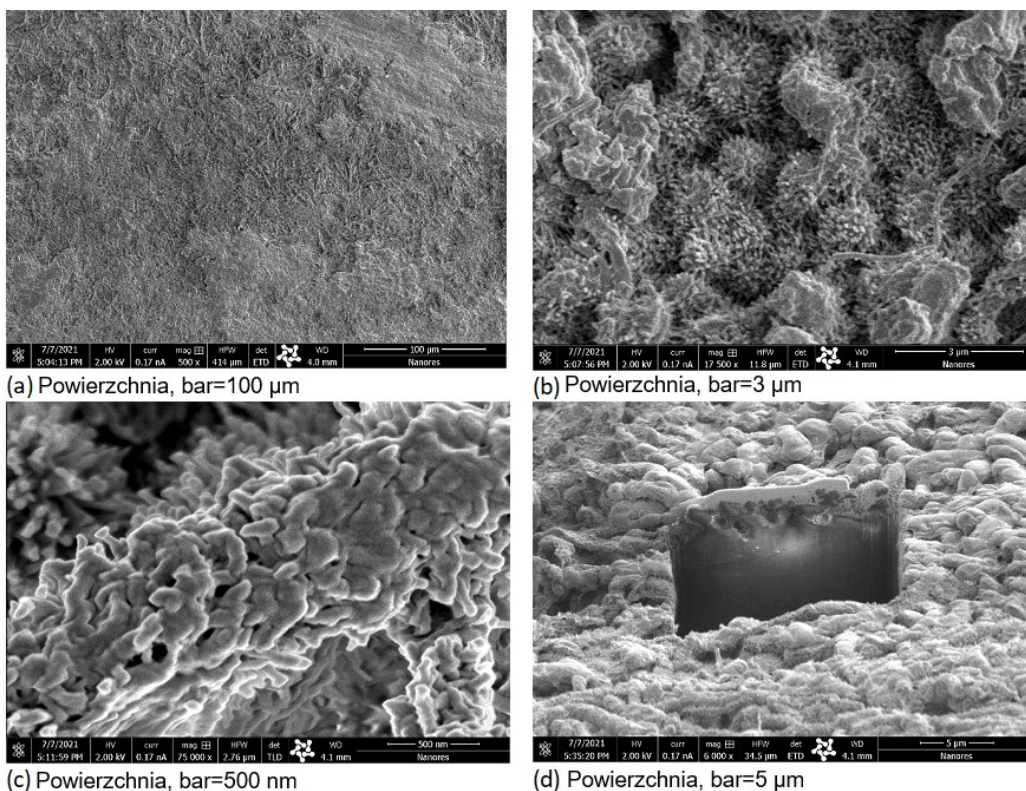
Zaszczepienie QAC do grupy funkcyjnej linkera HDI w strukturze modyfikowanego materiału spowodowało dalsze zmiany na powierzchni próbki. Zdjęcia SEM obu wariantów, tj. CA-QAC 1 i CA-QAC 2 przedstawiono kolejno na Rysunkach 3.36 i 3.37. W obu przypadkach materiały zachowały litą



(zwartą) strukturę. Jednakże oba warianty prowadzą do różnego wyglądu powierzchni modyfikowanych kulek z octanu celulozy. Porównanie zdjęć powierzchni wskazują na większą chropowatość w próbce zaszczipioną QAC 2 względem QAC 1.



Rysunek 3. 36 Zdjęcia SEM-FIB kulki z octanu celulozy szczepionej QAC 1 (CA-QAC 1): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d).

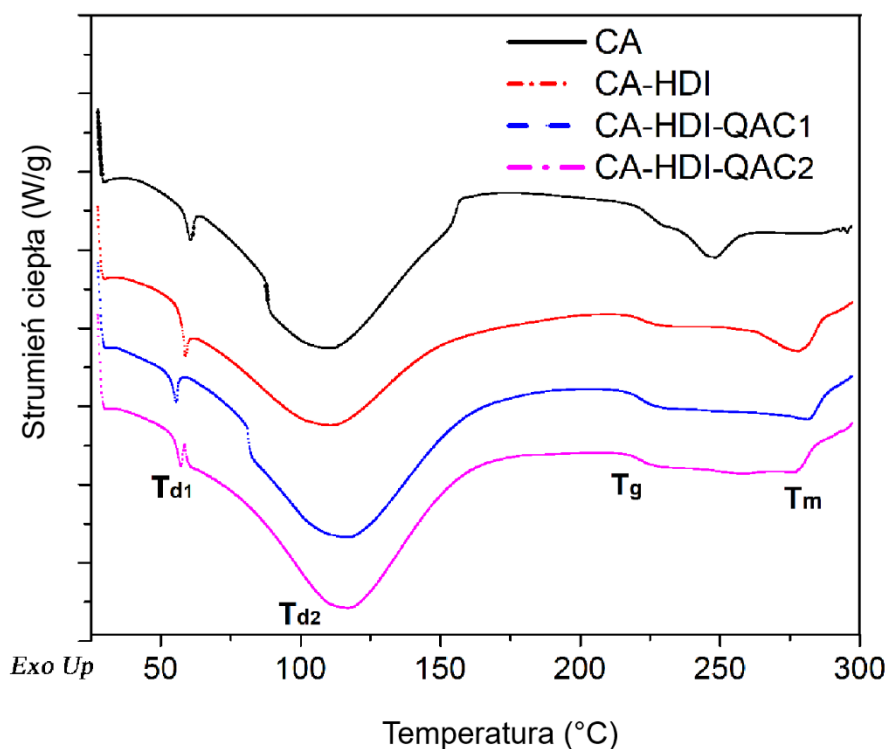


Rysunek 3. 37 Zdjęcia SEM-FIB kulki z octanu celulozy szczepionych QAC 2 (CA-HDI-QAC 2): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d).

Zjawiska termiczne zachodzące w próbkach zmodyfikowanych i niezmodyfikowanych, tj. (CA, CA-HDI, CA-QAC 1 i CA-QAC 2) zbadano za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC, *ang. differential scanning calorimetry*). Uzyskane wyniki ukazano na Rysunku 3.38 oraz w Tabeli 3.3. W pierwszym etapie wykryto dwie endotermie od temperatury pokojowej do około 150°C. Początkowe endotermie mają minima temperatury desorpcji ( $T_{d1}$ ) i zostały przypisane odparowaniu kwasu octowego z biopolimerów [179]. Drugie, szerokie endotermie (temperatury desorpcji  $T_{d2}$ ) przypisano desorpcji wody ze struktury polisacharydowej [139]. Wszystkie przedstawione krzywe mają wspólną cechę – obecność szerokiego endotermicznego zjawiska pomiędzy temperaturami 150°C i 300°C. Przypisać to można topnieniu regionów krystalicznych badanego polimeru (Temperatura topnienia,  $T_m$ ). Wykazano ponadto w tym regionie piki endotermiczne o niskiej intensywności odpowiadające temperaturze zeszklenia ( $T_g$ ).

Analiza DSC wykazała, że proces szczepienia spowodował nieznaczny spadek temperatury zeszklenia w zakresie od 225°C do 223°C i wzrost temperatury topnienia w zakresie od 248°C do 278°C, co przedstawiono w Tabeli 3.3 i Rysunku 3.38. Entalpia topnienia nieznacznie spadła po przyłączeniu łącznika i została znacznie zmniejszona po zaszczepieniu QAC. Krystaliczność spadła z 15,5% i 15,0% po pierwszym etapie szczepienia do 4,1% i 2,8% po przyłączeniu, odpowiednio, QAC 1 i QAC 2. Wyniki te wskazują na utratę wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami polimerów, które występowały przed modyfikacją w octanie celulozy. Badania DSC potwierdziły analizę ATR-FTIR i badanie kąta zwilżania, wykazując wyraźne rozróżnienie pomiędzy zmodyfikowanym i niezmodyfikowanym CA.





Rysunek 3. 38 Wyniki analizy DSC niezmodyfikowanych (CA) i szczepionych (CA-HDI, CA-HDI-QAC 1 i CA-HDI-QAC 2) kulek z octanu celulozy

Tabela 3. 3 Wyniki analizy DSC niezmodyfikowanych i szczepionych kulek polimerowych.

Próbka	T <sub>d1</sub> (°C)	T <sub>d2</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	χ <sub>c</sub> (%)
CA	60,8	110,1	224,9	247,8	9,1	15,5
CA-HDI	58,9	111,5	223,3	278,3	8,8	15,0
CA-QAC 1	55,5	115,8	223,1	282,0	2,4	4,1
CA-QAC 2	57,4	116,0	222,9	277,8	1,7	2,8

Wyniki badań przedstawione w Tabeli 3.4 przedstawiają wymaganą siłę ściskania przyłożoną do próbki w celu jej odkształcenia. Wyniki te wykazały, że szczepienie linkerem HDI zwiększa odporność na odkształcenia względem materiału pierwotnego. W drugim etapie modyfikacji szczepienie QAC spowodowało zmniejszenie odporności kulek na odkształcenia w porównaniu z próbką szczepioną linkerem HDI.

Tabela 3. 4 Odporność na odkształcenia kulek niezmodyfikowanych (CA), zaszczipionych linkerem (CA-HDI), zaszczipionych QAC (CA-QAC 1 oraz CA-QAC 2)

Próbka	Siła ściskania [N]
CA	114,7 ± 5,3
CA-HDI	192,0 ± 18,0
CA-QAC1	155,0 ± 25,0
CA-QAC2	136,7 ± 14,3

### 3.2.3.2 Analiza mikrobiologiczna

#### 3.2.3.2.1 Analiza właściwości antybiofilmowych

W poniższej Tabeli 3.5 przedstawiono wyniki badań antybiofilmowych, których metodyka została przedstawiona w Rozdziale 2.4.5. W tabeli przedstawiono uśrednione z trzech niezależnych pomiarów wyniki dla próbek octanu celulozy niezmodyfikowanej oraz zaszczipionego QAC 1 lub QAC 2.

Tabela 3. 5 Przyłączenie drobnoustrojów do CA, CA-HDI-QAC 1 i CA-HDI-QAC 2 wyrażone jako całkowita liczba jednostek tworzących kolonie na mm<sup>2</sup> (CFU/mm<sup>2</sup>).

Szczep bakterii	Statystyka opisowa	CA	CA-QAC 1	Cohen's d	CA-QAC 2	Cohen's d
<b><i>L. monocytogenes</i></b> <b>ATCC 13932</b>	$\bar{x}$	4,75·10 <sup>6</sup>	4,64·10 <sup>4</sup>	0,95	4,44·10 <sup>3</sup>	0,96
	SD	4,95·10 <sup>6</sup>	4,94·10 <sup>4</sup>		7,70·10 <sup>3</sup>	
<b><i>B. cereus</i></b> ATCC <b>11778</b>	$\bar{x}$	3,21·10 <sup>7</sup>	6,48·10 <sup>6</sup>	0,88	1,86·10 <sup>5</sup>	1,09
	SD	2,91·10 <sup>7</sup>	2,00·10 <sup>5</sup>		1,61·10 <sup>5</sup>	
<b><i>E. coli</i></b> ATCC <b>10536</b>	$\bar{x}$	4,64·10 <sup>6</sup>	3,84·10 <sup>6</sup>	0,15	0	0,86
	SD	5,36·10 <sup>6</sup>	7,25·10 <sup>5</sup>		0	
<b><i>S. Enteritidis</i></b> <b>ATCC 13076</b>	$\bar{x}$	1,67·10 <sup>5</sup>	2,83·10 <sup>4</sup>	1,03	0	1,24
	SD	1,35·10 <sup>5</sup>	5,00·10 <sup>3</sup>		0	
<b><i>S. aureus</i></b> ATCC <b>29213</b>	$\bar{x}$	5,23·10 <sup>6</sup>	2,37·10 <sup>5</sup>	1,10	0	1,15
	SD	4,53·10 <sup>6</sup>	9,67·10 <sup>4</sup>		0	
<b>MRSA* ATCC</b> <b>43300</b>	$\bar{x}$	2,04·10 <sup>6</sup>	5,80·10 <sup>4</sup>	1,03	0	1,06
	SD	1,93·10 <sup>6</sup>	5,12·10 <sup>4</sup>		0	

\*MRSA - Gronkowiec złocisty oporny na metycylinę, MRSA (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

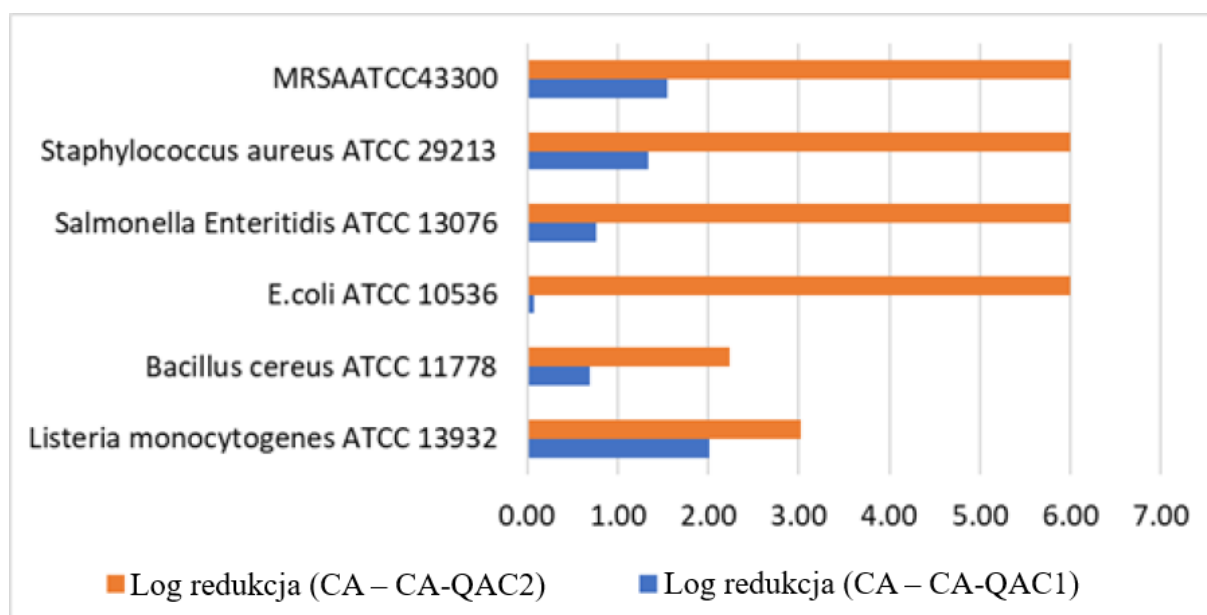
Stężenie bakterii w początkowym inokulum było równe 1·10<sup>5</sup> CFU/mL,

$\bar{x}$  - średnia wartość CFU/mL uzyskana w trzech niezależnych eksperymentach;

SD – odchylenie standardowe;

Wielkość efektu (d Cohena) obliczono poprzez porównanie całkowitej liczby CFU przyłączonej do CA-QAC 1 i CA-QAC 2 z całkowitą liczbą CFU przyłączonej do CA,

Rysunek 3.39 jest graficzną interpretacją wyników polegającą na zestawieniu wyników pomiaru foulingu próbki zmodyfikowanej do niezmodyfikowanej. Ukazana graficznie redukcja CFU pozwala na opis wpływu szczepienia QAC na liczbę bakterii na powierzchni badanego materiału. Dla lepszej czytelności wyniki przedstawiono w formie logarytmicznej.



Rysunek 3. 39 Redukcja całkowitej liczby bakterii przyłączonych do CA-QAC 1 i CA-QAC 2 (obliczona dla 99,9% redukcji dla CA-QAC 2) w porównaniu z CA, wyrażona jako log CFU,

Przedstawione wyniki w Tabeli 3.5 i graficzna reprezentacja tychże wyników na Rysunku 3.39 wykazują znaczący wpływ na zdolność badanych szczepów do adhezji do próbek zaszczepionych względem niezmodyfikowanego CA.

Szczepy: *E. coli* ATCC 10536, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 29213 i MRSA ATCC 43300 nie były zdolne do adhezji do powierzchni CA- QAC 2 po 24 godzinach inkubacji w każdym z 3 niezależnych eksperymentów.

Szczep *L. monocytogenes* ATCC 13932 był zdolny do adhezji w łącznej liczbie  $4,75 \times 10^6$  CFU/mm<sup>2</sup> do powierzchni CA, oraz w łącznej liczbie  $4,64 \times 10^4$  CFU/mm<sup>2</sup> do powierzchni CA- QAC 1 (redukcja o 2,01 [logCFU] w stosunku do CA,  $R^2 = 0,655$ ,  $P = 0,0006$ ) i w łącznej liczbie  $4,44 \times 10^3$  CFU/mm<sup>2</sup> do powierzchni CA-QAC 2 (redukcja o 3,03 [log CFU] w stosunku do CA,  $R^2 = 0,655$ ,  $P = 0,0007$ ).

*B. cereus* ATCC 11778 był szczepem, który wykazał największą zdolność do adhezji do powierzchni badanych materiałów. Liczbie komórek przytwierdzonych do powierzchni wyniosła  $3,21 \times 10^7$  CFU/mm<sup>2</sup> na powierzchni CA,  $4,32 \times 10^6$  CFU/mm<sup>2</sup> na powierzchni CA-QAC 1 (redukcja o 0,87 [logCFU] w stosunku do CA,  $R^2 = 0,668$ ,  $P = 0,0023$ ) i w łącznej liczbie  $1,86 \times 10^5$  do powierzchni CA-QAC 2 (redukcja o 2,24 [logCFU] w stosunku do CA,  $P = 0,0003$ ).

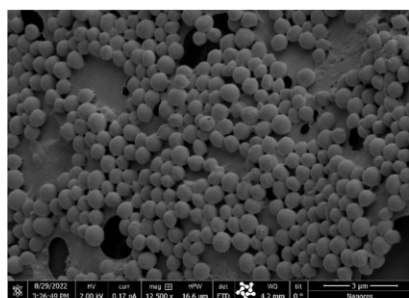
Szczep *E. coli* ATCC wykazał adhezję do powierzchni CA-QAC 1 w niemal identycznej liczbie jak do CA (statystycznie nieistotna redukcja 0,08 [log CFU],  $R^2 = 0,5489$ ,  $P = 0,805$ , d Cohena 0,15).

Uzyskano redukcję liczby bakterii badanego szczepu *S. aureus* dla materiału CA-QAC 1 względem nieszczepionego CA (redukcja o 1,34 [logCFU],  $R^2 = 0,7102$ ,  $P = 0,0004$ , d Cohena 1,15).

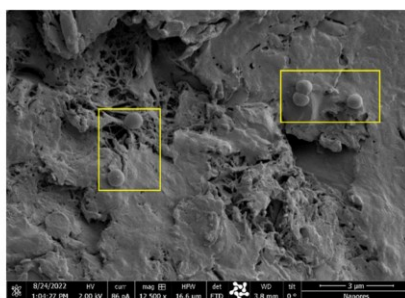
CA zaszczone QAC 2 wykazywało znaczny i wyraźny efekt przeciwadhezyjny. Widoczna zdolność *B. cereus* ATCC 11778 i *L. monocytogenes* ATCC 13932 do przewyciężenia działania właściwości antyadhezyjnych CA-QAC 2 wskazuje na zdolność do szybkiej adaptacji tych szczepów do niekorzystnych warunków. Szczepy te jednak nie mają tak dużego znaczenia, jak szczep *S.aureus* w kontekście zakażeń i związanymi z nimi urządzeniami medycznymi. Zgłaszano, jednakże w Japoni bakterie (tzn., obecność bakterii we krwi) wywołowaną przez gatunki *Bacillus*, której źródłem były wyroby medyczne [180].

Raportowano, że *B. cereus* wytwarza specyficzny biosurfaktant, który umożliwia mu łatwiejsze przyleganie i tworzenie biofilmów w warunkach, w których giną inne bakterie, nawet w obecności QAC [181]. Donoszono, że *L. monocytogenes* może łatwo adaptować się, namnażać i tworzyć biofilmy w obecności dawek QAC poniżej dawki śmiertelnej [182]. Właściwości tychże szczepów przyczyniają się do stosowania ich w większości badań biofilmu. Są one w stanie tworzyć biofilm na powierzchniach, gdzie inne bakterie nie są w stanie przeprowadzić adhezji [183].

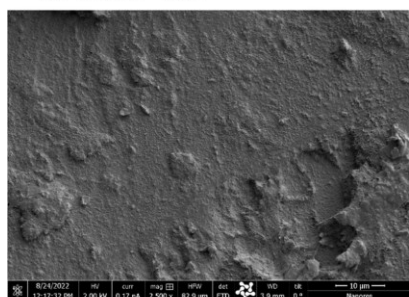
Badanie SEM potwierdziło wyniki zaobserwowanych efektów przeciwadhezyjnych. Obrazy SEM powierzchni niezmodyfikowanych CA oraz szczepionych CA-QAC 1 i CA-QAC 2 po ekspozycji na szczep MRSA ATCC 43300 przedstawiono na Rysunku 3.40. Zdjęcie powierzchni niezmodyfikowanej próbki pozwalała na wskazanie wielu kolonii na badanej powierzchni, co wykazano na Rysunku 3.40a. Analiza powierzchni zmodyfikowanej QAC 1 wykazała brak widocznego biofilmu przy pojedynczych, planktonicznych komórkach bakterii, które zaznaczono żółtymi prostokątami (Rysunek 3.40b). Zaprezentowana na Rysunku 3.40c powierzchnia próbki CA-QAC 2 była wolna od bakterii.



(a) CA, bar = 3 μm



(b) CA-HDI-QAC 1, bar = 3 μm



(c) CA-HDI-QAC 2, bar = 10 μm

Rysunek 3. 40 Powierzchnie polimerowe po ekspozycji na szczep MRSA ATCC 43300. Niezmodyfikowany CA (a), CA-QAC 1 (b) i CA-QAC 2 (c),

Wyprodukowanie materiału CA-QAC 2, który uniemożliwia adhezję dwóch, szczególnie groźnych szczepów: *S.aureus* ATCC 29213 i opornego na metycylinę *S.aureus* ATCC 43300 jest zdecydowanym sukcesem. Szczepy te naturalnie żyją na skórze zdrowego człowieka, toteż niemożliwym jest zapobiec przedostaniu się go do budynków szpitalnych, lecznic itd [184].

W miejscach takich wdrażane są różne środki ostrożności w zakresie aseptyki i antyseptyki (promieniowanie UV, sterylizacja, zastosowanie środków dezynfekcyjnych, rękawiczek chirurgicznych, maseczek na twarz). Mimo wszystko zanieczyszczenie polimerowych wyrobów medycznych gronkowcami podczas pracy jest nadal zjawiskiem codziennym, najczęściej podczas zabiegów chirurgicznych [133], [184].

Gronkowce (łac. *Staphylococcus*) wytwarzają całe spektrum toksyn i czynników wirulencji, które to odpowiadają za niezwykłą zdolność przylegania do powierzchni polimerów medycznych oraz wytwarzania wysoce odpornych biofilmów. Prowadzi to w konsekwencji do ogromnej liczby powikłań u pacjentów z wszczepionymi środkami medycznymi [[133]. Właśnie dlatego największa liczba publikacji traktująca na ten temat dotyczy szczepów *S.aureus*. Według naszej najlepszej wiedzy opublikowane badanie [135] jest pierwszym dotyczącym szczepienia octanu celulozy biocydem przeciwko biofilmom szczepów *B.cereus*, *L. monocytogenes* i *S. Enteritidis*.

#### 3.2.3.2.2 Analiza właściwości antybakteryjnych

Dalsza analiza została przeprowadzona w celu ustalenia, czy z zaszczepionego materiału następuje uwalnianie substancji aktywnej QAC, co miałyby wpływ na namnażanie bakterii w bulionie. Brak wpływu na namnażanie bakterii w bulionie świadczyłby o kowalencyjnym połączeniu QAC ze strukturą materiału. Wyniki wpływu polimerów na namnażanie bakterii w pożywce płynnej przedstawiono w Tabeli 3.6. Na Rysunku 3.41 przedstawiono graficznie redukcję CFU w bulionie, w którym umieszczono modyfikowany materiał względem liczby CFU w bulionie z niezmodyfikowaną kulką z octanu celulozy. Dla lepszej czytelności wyniki przedstawiono w formie logarytmicznej.

Obecność próbki CA-QAC 2 wpłynęła na namnażanie prawie wszystkich badanych bakterii w porównaniu z niezmodyfikowanym materiałem. Wyjątkiem był badany szczep *L. monocytogenes* ATCC13932, wobec którego nie stwierdzono wpływu szczepienia na liczbę bakterii w bulionie. Obecność CA-QAC 2 w bulionie spowodowała redukcję całkowitej liczby MRSA ATCC 43300 w porównaniu z niezmodyfikowanym octanem celulozy w bulionie (redukcja o 1,90 [logCFU],  $R^2 = 0,816$ ,  $P < 0,0001$ ) oraz słabą redukcję w przypadku *S. Enteritidis* (redukcja o 0,47 [logCFU],  $R^2 = 0,92$ ,  $P < 0,0001$ ) i *E. coli* ATCC 10536 (redukcja o 0,27 [logCFU],  $R^2 = 0,946$ ,  $P < 0,0001$ ),

Tabela 3. 6 Całkowita liczba bakterii (CFU/mL) po 24 h inkubacji w bulionie sojowym Trypton z próbkami: CA, CA-HDI-QAC 1 i CA-HDI-QAC 2.

Szczep bakterii	Statystyka opisowa	Grupa kontrolna	CA	Cohen's d	CA-QAC 1	Cohen's d	CA-QAC 2	Cohen's d
<b>S. aureus</b> ATCC 29213 *	$\bar{x}$	$7,43 \cdot 10^7$	$4,76 \cdot 10^7$	2,56	$3,82 \cdot 10^7$	3,47	$1,98 \cdot 10^6$	6,94
	SD	$1,04 \cdot 10^7$	$1,43 \cdot 10^7$		$1,81 \cdot 10^7$		$3,97 \cdot 10^5$	
<sup>1</sup> MRSA ATCC 43300 *	$\bar{x}$	$7,11 \cdot 10^7$	$5,21 \cdot 10^7$	0,91	$2,28 \cdot 10^7$	2,31	$8,96 \cdot 10^5$	3,35
	SD	$2,09 \cdot 10^7$	$1,01 \cdot 10^7$		$3,74 \cdot 10^7$		$8,38 \cdot 10^5$	
<b>S. Enteritidis</b> ATCC 13076 *	$\bar{x}$	$1,25 \cdot 10^8$	$1,24 \cdot 10^8$	0,07	$7,60 \cdot 10^7$	2,32	$4,28 \cdot 10^7$	3,89
	SD	$2,12 \cdot 10^7$	$1,57 \cdot 10^7$		$2,14 \cdot 10^7$		$7,44 \cdot 10^6$	
<b>E. coli</b> ATCC 10536 *	$\bar{x}$	$3,85 \cdot 10^7$	$4,165 \cdot 10^7$	-0,71	$3,785 \cdot 10^7$	0,15	$2,06 \cdot 10^7$	4,13
	SD	$4,33 \cdot 10^6$	$3,26 \cdot 10^6$		$1,87 \cdot 10^6$		$3,69 \cdot 10^6$	
<b>L. monocytogenes</b> ATCC 13932 *	$\bar{x}$	$1,03 \cdot 10^6$	$3,23 \cdot 10^6$	-9,80	$6,11 \cdot 10^5$	1,85	$1,02 \cdot 10^6$	0,05
	SD	$2,25 \cdot 10^5$	$1,56 \cdot 10^6$		$1,51 \cdot 10^5$		$1,76 \cdot 10^5$	
<b>B. cereus</b> ATCC 11778 *	$\bar{x}$	$1,70 \cdot 10^8$	$1,63 \cdot 10^8$	0,39	$1,29 \cdot 10^8$	2,41	$1,39 \cdot 10^7$	9,23
	SD	$1,69 \cdot 10^7$	$1,86 \cdot 10^6$		$4,70 \cdot 10^7$		$1,06 \cdot 10^7$	

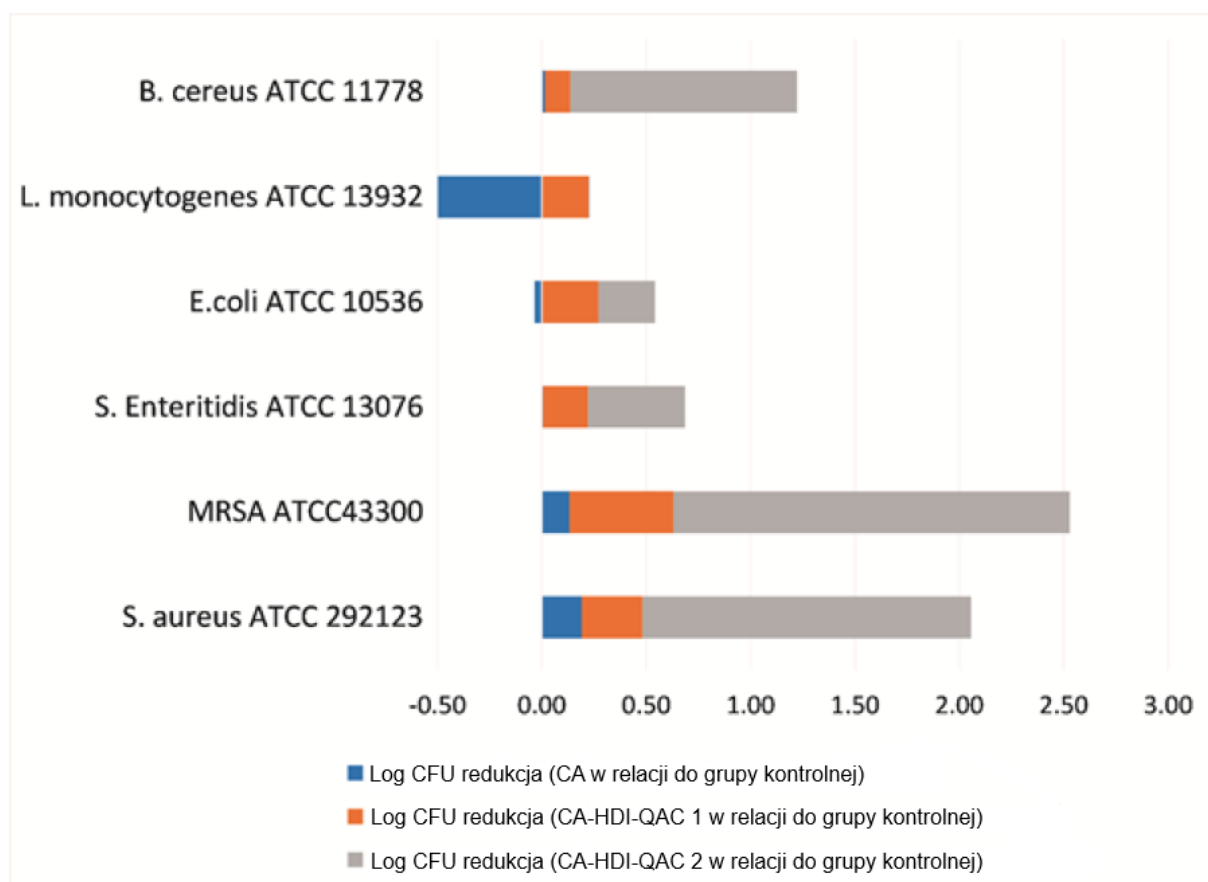
\*MRSA - Gronkowiec złocisty odporny na metycylinę, MRSA (ang, methicillin-resistant Staphylococcus aureus)

Stężenie bakterii w początkowym inokulum było równe  $1 \cdot 10^5$  CFU/mL,

$\bar{x}$ - średnia wartość CFU/mL uzyskana w trzech niezależnych eksperymentach;

SD – odchylenie standardowe;

Wielkość efektu (d Cohena) obliczono poprzez porównanie całkowitej liczby CFU przyłączonej do CA-QAC 1 i CA-QAC 2 z całkowitą liczbą CFU przyłączonej do CA,



Rysunek 3. 41 Redukcja całkowitej liczby bakterii w logCFU po 24 godzinnej inkubacji w bulionie sojowym Tryptone z CA, CA-QAC 1 i CA-QAC 2, Ujemna wartość logCFU wskazuje na zwiększony wzrost liczby bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej (bez materiału),

Szczepienie kulek z octanu celulozy przy pomocy QAC 1 również miało pozytywny wpływ na redukcję liczby bakterii w bulionie wobec badanych szczepów. Efekt ten, względem próbki szczepionej QAC 2, był mniejszy z wyjątkiem szczepu *L. monocytogenes* ATCC 13932. Wobec MRSA ATCC43300 nastąpiła słaba redukcja liczby bakterii w bulionie (redukcja 0,49 [log CFU],  $P < 0,0001$ ), zaś wobec *S. aureus* ATCC 29213 nastąpiła redukcja 0,29 [log CFU], ( $P < 0,0001$ ), wobec *E. coli* ATCC 10536 redukcja wyniosła 0,27 [log CFU] ( $P < 0,0001$ ) i 0,23 log redukcji CFU w *L. monocytogenes* ATCC 13932 ( $P < 0,0001$ ).

Również obecność niezmodyfikowanego CA miało wpływ na namnażanie bakterii. Zaobserwowano niewielki, aczkolwiek statystycznie istotny, hamujący namnażanie wpływ na szczepy *S. aureus* ATCC 29213 (redukcja o 0,19 [logCFU],  $R^2 = 0,925$ ,  $P < 0,0001$ , d Cohena 2,56) i MRSA ATCC43300 (redukcja o 0,13 [logCFU],  $p < 0,0001$ , d Cohena 0,91). Niewielki, lecz statystycznie istotny, stymulujący namnażanie wpływ wystąpił względem szczepu *L. monocytogenes* ATCC 13932 (-0,50 [logCFU],  $R^2 = 0,841$ ,  $P < 0,0001$ , d Cohena -9,80). Podobny, choć statystycznie nieistotny efekt stymulacji namnażania zaobserwowano także dla szczepu *E. coli* ATCC 10536 (-0,03 [log CFU],  $P < 0,093$ , d Cohena -0,71).

Wyniki mikrobiologiczne wykazały, że obecność materiałów posiadających właściwości antybiofilmowe nie wywarła istotnego wpływu na liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU) bakterii w bulionie. Chociaż

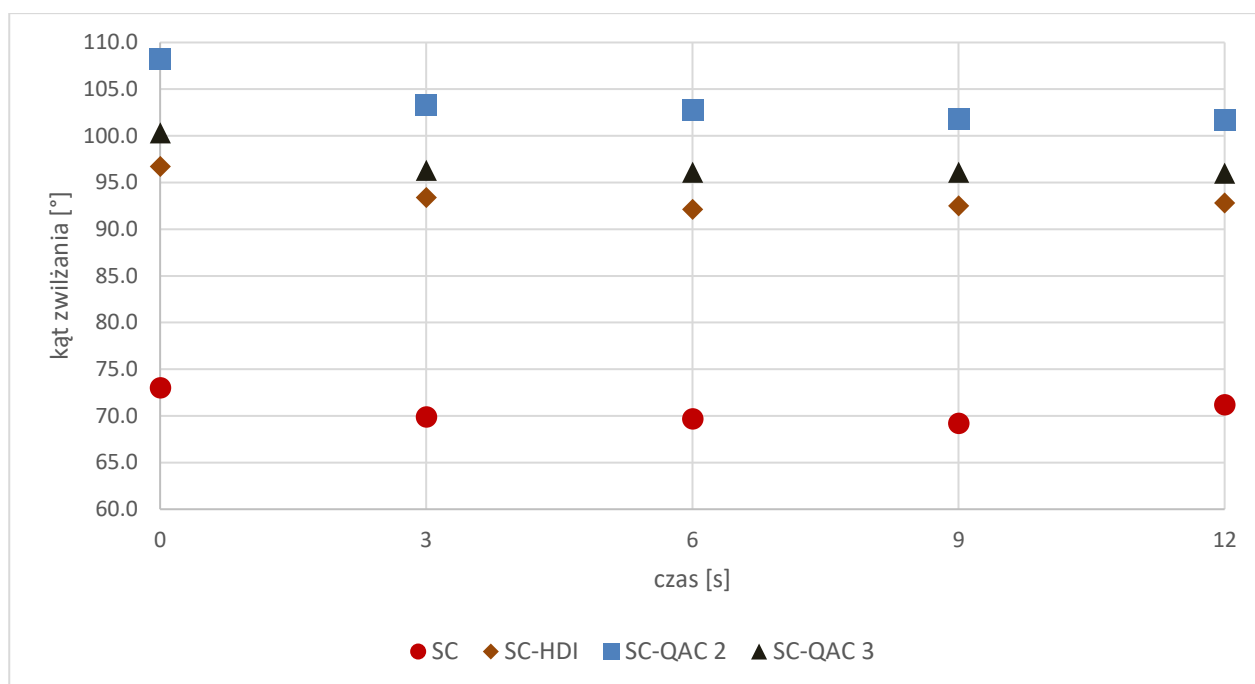
obserwowana zmiana była statystycznie istotna, to mikrobiologicznie miała ona marginalne znaczenie [185]. Te wyniki sugerują, że zaobserwowane efekty wynikały głównie z kontaktu badanych szczepów z powierzchnią antybiofilmową, co wskazuje na kowalencyjne przyłączenie substancji aktywnej do powierzchni materiałów.

### 3.2.4 Szczepienie w fazie nadkrytycznej blendu skrobiowo-chitozanowego

Wykonano 20 eksperymentów szczepienia nadkrytycznego blendów skrobiowo-chitozanowych, które wykazały, że przyłączenie linkera HDI zwiększyło masę blendu średnio o 11,1%. Badania przeprowadzone przez Xu i in. wykazały, że szczepienie nadkrytyczne linkera HDI do drewna iglastego skutkowało zwiększeniem masy drewna o 30% [[101].

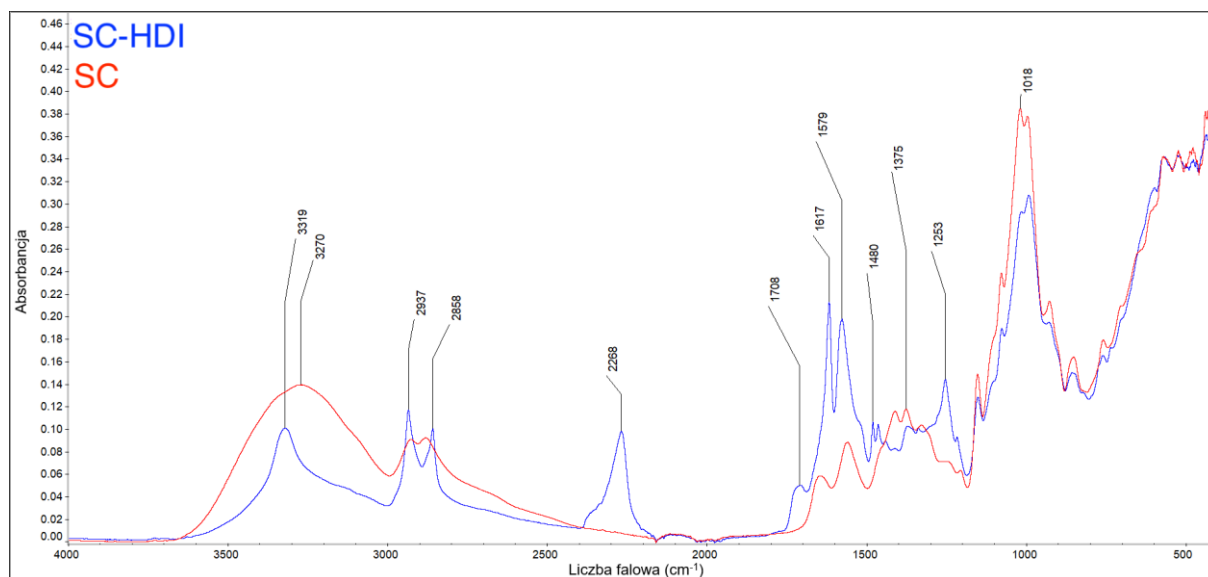
Wyniki badania zwilżalności membran skrobiowo-chitozanowych zostały przedstawione na Rysunku 3.42. Badania wykonano na membranach z blendów polimerowych wytwarzanych metodą „solvent casting”. Procedura produkcji membran nieporowatych z blendów polimerowych została opisana w Rozdziale 2.4.3. Kąt zwilżania niezmodyfikowanej membrany skrobiowo-chitozanowej wyniósł w badanym czasie średnio 70,6°. Pierwszy krok reakcji, tj. zaszczepienie linkerem HDI, zwiększył wartość kąta zwilżania do średniej wartości 93,5°. Zaszczepienie przy pomocy QAC 3 zwiększyło kąt zwilżania do średnio 97,0°. Największy wzrost obserwowany jest dla zaszczepienia QAC 2, który zwiększył kąt zwilżania do średnio 103,6°. Wyniki te wskazują, że szczepienie przy pomocy QAC membran skrobiowo-chitozanowych znacznie zwiększa hydrofobowość powierzchni membrany w porównaniu do membrany niezaszczepionej. Zdjęcia kropli wody na powierzchni membran skrobiowo-chitozanowych niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych w czasie 12 sekund przedstawiono w Tabeli Z.2 w załączniku.





Rysunek 3. 42 Kąt zwilżania w funkcji czasu dla niezmodyfikowanej membrany z blendów skrobiowo-chitozanowych (SC), membran SC szczepionych linkerem (SC-HDI) i membran po szczepieniu czwartorzędowymi związkami amoniowymi (QAC) (SC-QAC 2 i SC-QAC 3).

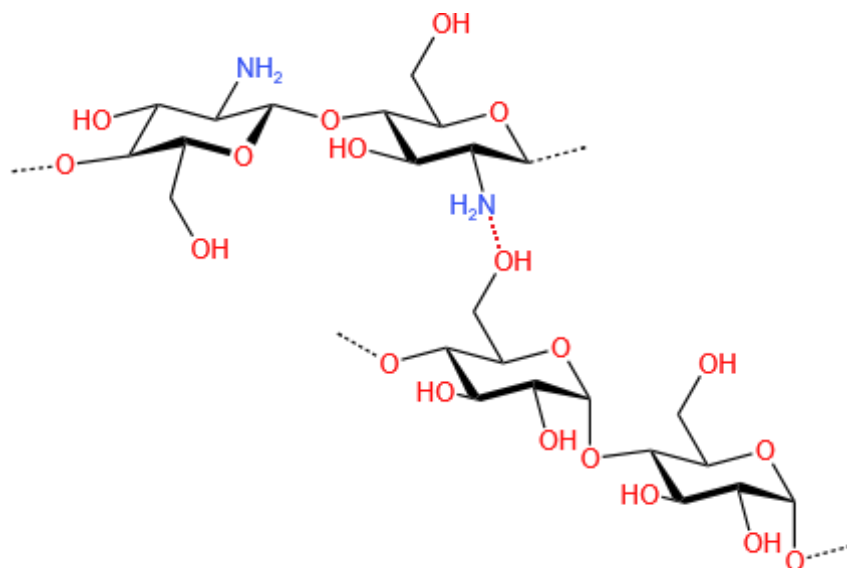
Porównanie widm FTIR dla filmów skrobiowo-chitozanowych (SC) oraz SC zaszczepionych linkerem HDI przedstawiono na Rysunku 3.43. Wzór strukturalny materiału zaszczepionego linkerem HDI przedstawiono na Rysunku 3.29.



Rysunek 3. 43 Widma FTIR niezmodyfikowanych (SC) i szczepionych linkerem (SC-HDI) blendów skrobiowo-chitozanowych.

W widmie FTIR blendu skrobiowo-chitozanowego szerokie pasmo widoczne przy  $3270\text{ cm}^{-1}$  przyporządkowano grupie hydroksylowej OH [186]. Pik przy  $2937\text{ cm}^{-1}$  jest charakterystyczny dla drgań rozciągających grupy C-H [186], [187]. Pik przy  $1650\text{ cm}^{-1}$  należą do drgań rozciągających grupy

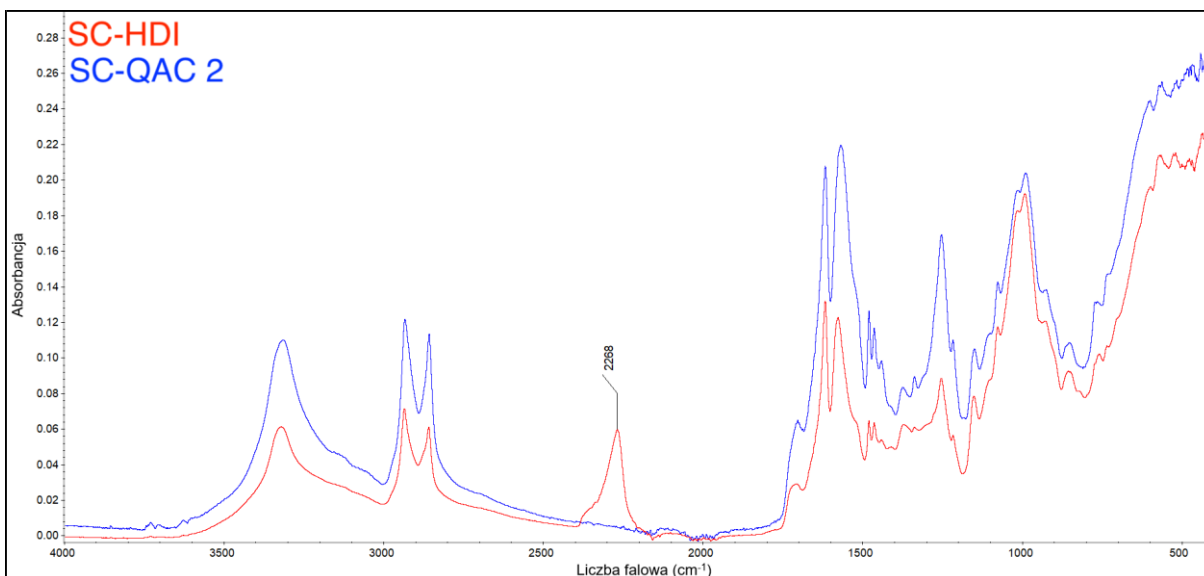
amidowej C=O [186], [188]. Pik przy  $1555\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się absorpcji amidu  $\text{NH}_2$  i wskazuje on na interakcje zachodzące między grupami hydroksylowymi skrobi a grupami aminowymi chitozanu [189]. Interakcja ta została ukazana na Rysunku 3.44 przerywaną czerwoną linią.



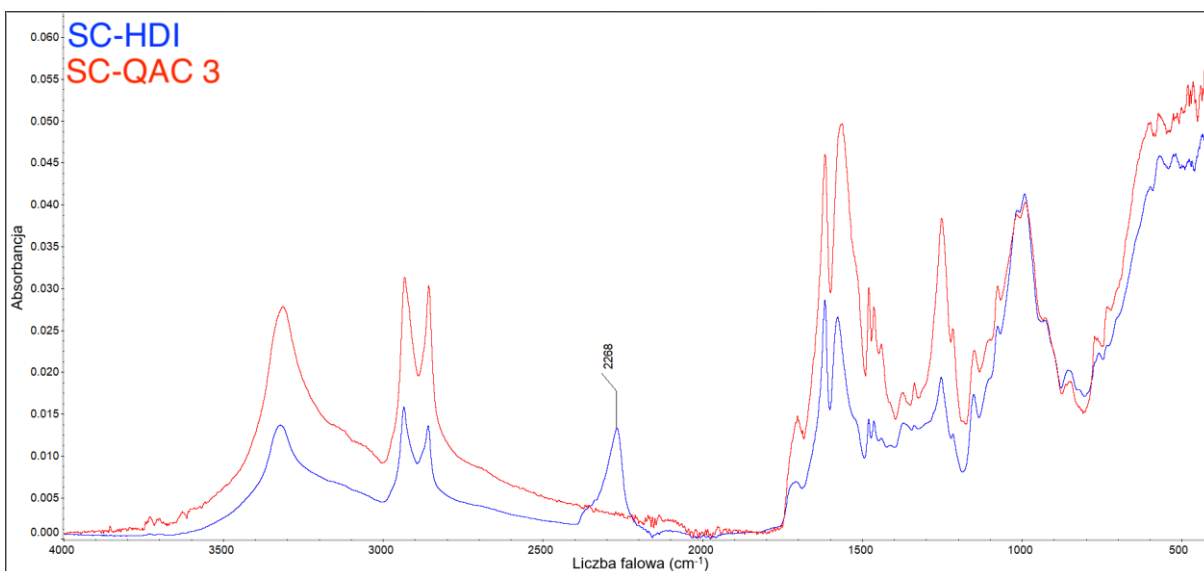
Rysunek 3. 44 Wzór strukturalny blendu skrobiowo-chitozanowego. Potencjalne interakcje między skrobią a chitozanem zaznaczono przerywaną, czerwoną linią.

Zanik szerokiego pasma należącego do grupy hydroksylowej świadczy o jego przereagowaniu. W jego miejscu pojawiły się drgania rozciągające należące do grupy  $\text{NH}$  [101]. Świadczy to o skutecznym procesie szczypania. Szczególnym pikiem charakterystycznym świadczącym o przyłączeniu linkera HDI jest pojawienie się grupy izocyjanianowej przy paśmie  $2268\text{ cm}^{-1}$  [176], [190]. Piki przy  $2937\text{ cm}^{-1}$  należą do grup  $\text{CH}$  zaszczepionego HDI [101], [176], [177].

W drugim etapie reakcji szczypania nadkrytycznego (Rysunek 2.10) przyłączono QAC 2 lub QAC 3 do blendu skrobiowo-chitozanowego zaszczepionego HDI. Masa zaszczepionych blendów polimerowych zmniejszyła się po przyłączeniu QAC średnio o 3,5%. W artykule Xu i in. [101] zaraportowano zmniejszenie masy o 1,18% po zaszczepieniu QAC do materiału. Rysunek 3.45 ukazuje porównanie widm zaszczepionego linkerem HDI blendu skrobiowo-chitozanowego (SC-HDI) oraz kolejno materiał zaszczepiony QAC 2 i QAC 3. Schemat reakcji zaszczepienia QAC do struktury materiału z przyłączonym linkerem HDI przedstawiono na Rysunku 2.10. Wzory strukturalne materiałów uzyskanych po przyłączeniu QAC 2 i QAC 3 przedstawiono kolejno na Rysunku 3.30b i 3.30c. Porównywane widma są podobne z wyjątkiem zaniku grupy izocyjanianowej ( $2268\text{ cm}^{-1}$ ), co świadczy o przereagowaniu tej grupy przez QAC. Dla obu przypadków całkowite przereagowanie tej grupy świadczy o skutecznym zaszczepieniu QAC do SC-HDI.



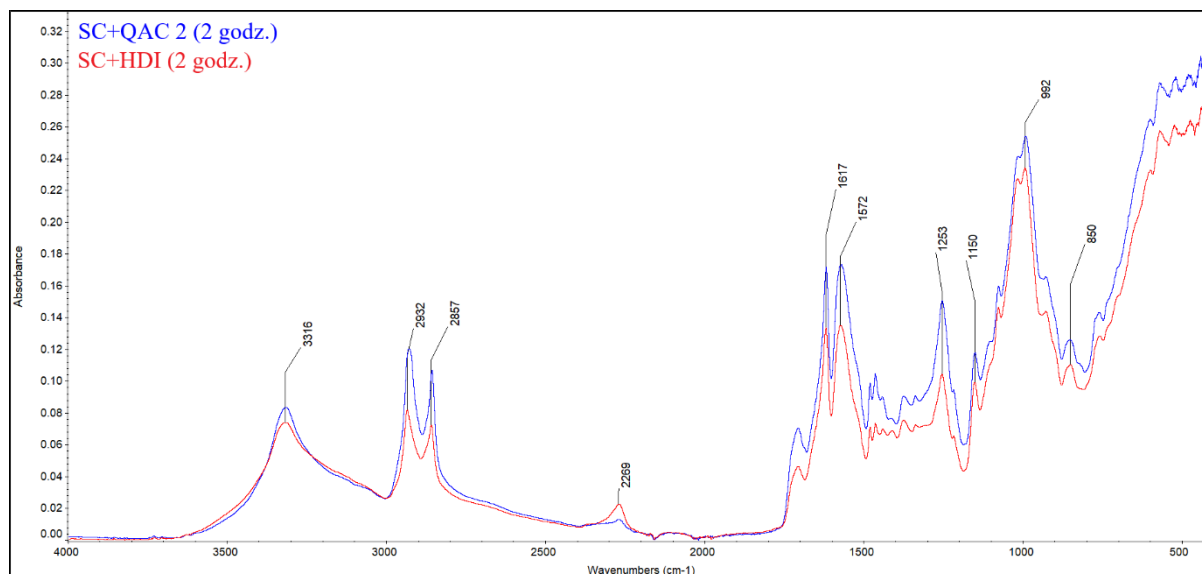
a)



b)

Rysunek 3. 45 Widma FTIR blendów skrobiowo-chitozanowych (SC) z porównaniem próbek zaszczepionych HDI i QAC 2 (a) oraz HDI i QAC 3 (b).

Wykazano ponadto, że minimalny czas potrzebny na przereagowanie grup hydroksylowych blendu skrobiowo-chitozanowego i pojawienie się grupy izocyjanianowej (świadczącej o sukcesie szczepienia) w pierwszym etapie modyfikacji to 4 godziny. Podobnie 4 godziny były wymagane, by zaszczepić QAC do grupy izocyjanianowej. Skrócenie czasu reakcji do 2 godzin skutkowało nieprzereagowaniem w całości grup hydroksylowych w pierwszym etapie, natomiast w drugim etapie grupa izocyjanianowa nadal była widoczna po szczepieniu. Sytuacja taka została przedstawiona na Rysunku 3.46.



Rysunek 3. 46 Widma FTIR blendu skrobiowo-chitozanowego zaszczipionego linkerem (SC-HDI) z porównaniem do próbki zaszczipionej QAC2 przez 2 godziny (SC-QAC2-2h). Widoczny pik przy 2269  $\text{cm}^{-1}$  świadczy o nieprzereagowanej grupie izocyjanianowej.

### 3.2.5 Wnioski z badań dotyczących szczepienia w fazie nadkrytycznej

Zsyntezowano trzy czwartorzędowe związki amoniowe (QAC): bromek N-(2-hydroksyetylo)-N,N-dimetylundekano-1-aminy (QAC 1), bromek N-(11-hydroksyundekanylo)-N,N-dimetylotetradekan-1-aminy (QAC 2) oraz bromek N-(11-hydroksyundekanylo)-N,N-dimetylooktan-1-aminy (QAC 3).

QAC 1 i QAC 2 przyłączono do zaszczipionego linkerem octanu celulozy poprzez wiązanie karbaminianowo-uretanowe. Reakcje prowadzono w nadkrytycznym ditlenku węgla w 70°C i 30 MPa. Modyfikacja octanu celulozy wymagała minimum 6 godzin dla obu etapów procesu na pojawienie lub zaniku charakterystycznych pików w widmie FTIR świadczących o skutecznym przeprowadzeniu szczepienia w fazie nadkrytycznej.

W charakterystyce szczepionego octanu celulozy wykazano, że przereagowanie grup hydroksylowych odpowiedzialnych za oddziaływania międzycząsteczkowe struktury polimerowej doprowadziło do zmniejszenia krystaliczności polimeru oraz wystąpienia chropowatej powierzchni materiału. Zdjęcia SEM przekroju wykazały zachowanie litej (zwartej) struktury polimeru. Porównanie widm FTIR powierzchni zaszczipionych kulek z octanu celulozy oraz ich wnętrza wykazało, że reakcja szczepienia nastąpiła w całej objętości polimeru. Powierzchnia zmodyfikowanych filmów z octanu celulozy wykazały wzrost właściwości hydrofobowych względem niezamodyfikowanych próbek ze stabilnym kątem zwilżania wynoszącym 107,7° i 112,3° odpowiednio dla polimeru szczepionego QAC 1 i QAC 2.

Wszystkie badane szczepy wykazały statystycznie i mikrobiologicznie istotne różnice w ich zdolności adhezji do CA-QAC 2 i CA-QAC 1 w porównaniu z materiałem niezaszczipionym.

Badania mikrobiologiczne przeprowadzone na próbkach z octanu celulozy wykazały, iż uzyskany materiał CA-QAC 2 spowodował całkowitą niemożność przyłączenia *S. aureus* ATCC 29213 i MRSA ATCC 43300, co potwierdzono w trzech niezależnych eksperymentach. Podobnie ani *E. coli* ATCC 10536, ani *S. Enteritidis* ATCC 13076 nie były w stanie zbudować biofilmu na powierzchni CA-QAC 2. Wobec szczepów *B. Cereus* i *L. monocytogenes* uzyskano spadek LogCFU wynoszący kolejno 2,24 i 3,03 względem materiału niezaszczepionego. Wykazuje to, że polimer CA-QAC 2 wykazywał doskonałe właściwości antybiofilmowe w stosunku do testowanych szczepów. Uzyskany materiał CA-QAC 1 również redukował liczbę przyłączonych komórek bakterii do materiału, lecz w mniejszym stopniu względem CA-QAC 2. Przykładowo względem szczepów *L. monocytogenes*, MRSA i *S. aureus* uzyskano redukcję LogCFU kolejno 2,01, 1,55 oraz 1,34.

QAC 2 i QAC 3 przyłączono do zaszczepionego linkerem blendu skrobiowo-chitozanowego poprzez wiązanie karbaminianowo-uretanowe. Reakcje szczepienia prowadzono w nadkrytycznym ditlenku węgla w 70°C i 30 MPa. Eksperymenty dotyczące blendów polimerowych wymagały minimum 4 godzin szczepienia dla obu procesów, by pojawiły się lub zanikły charakterystyczne piki w widmie FTIR potwierdzające zajście reakcji szczepienia.

Pomiary zwilżalności filmów z blendów skrobiowo-chitozanowych wykazały wzrost hydrofobowości powierzchni ze stabilnym kątem zwilżania wynoszącym średnio 103,6° i 97,0° odpowiednio dla blendów szczepionych QAC 2 oraz QAC 3.

Metoda szczepienia nadkrytycznego pozwala na uzyskanie nowych materiałów w procesie pozbawionym produkcji ścieków wodnych i organicznych. W trakcie procesu nie wykorzystywano rozpuszczalników organicznych. Uzyskane materiały zyskały długotrwałe właściwości antybiofilmowe ze względu na istniejące wiązania kowalencyjne między strukturą polimeru pierwotnego a zaszczepioną substancją aktywną.

## 4 Podsumowanie

Praca ta opisuje metody wykorzystania płynu nadkrytycznego w procesie modyfikacji materiałów polimerowych celem otrzymania materiałów o właściwościach antybakteryjnych i antybiofilmowych. W ramach badań przeprowadzono szereg eksperymentów, które dostarczyły informacji na temat wpływu parametrów procesowych, tj. temperatura, ciśnienie, czas, na proces otrzymywania nowatorskich materiałów o pożądanych właściwościach. W pracy podjęto się modyfikacji octanu celulozy, poliamidu oraz blendów skrobiowo-chitozanowych. Membrany komercyjne z octanu celulozy oraz poliamidu zmodyfikowano metodą impregnacji nadkrytycznej, natomiast membrany z octanu celulozy i z blendów polimerowych uzyskane metodą „solvent casting” zmodyfikowano metodą szczepienia nadkrytycznego.

W pracy stosowano nadkrytyczny ditlenek węgla jako rozpuszczalnik, medium transportowe oraz – dodatkowo w przypadku reakcji szczepienia – medium reakcji.

W procesie impregnacji nadkrytycznej zaimpregnowano karwakrolem membrany z octanu celulozy i poliamidu. Dla obu materiałów przedstawiono kinetykę impregnacji, która wykazała, że wraz ze wzrostem ciśnienia następuje szybsza impregnacja substancji aktywnej do struktury materiału. Badania wykazały, że zaimpregnowane karwakrolem poliamidowe membrany zachowały pierwotną strukturę porowatą, natomiast zaimpregnowane w 20% i 25% membrany z octanu celulozy osiągały największy strumień permeatu w testach filtracji krzyżowej. Zastosowanie karwakrolu jako substancji aktywnej zaimpregnowanej do struktury membrany z octanu celulozy obniżyło znacząco liczbę zdeponowanych na membranie bakterii szczepu *S. aureus*. Membrany poliamidowe zaimpregnowane karwakrolem obniżały liczbę zanieczyszczeń bakteriami z powietrza w modelu klatki piersiowej symulującej otwartą ranę chirurgiczną. Otrzymane materiały wykazywały właściwości antybakteryjne przy zachowaniu funkcjonalności membrany.

W ramach drugiej metody modyfikacji materiałów polimerowych zsyntezowano trzy czwartorzędowe związki amoniowe, które przyłączono w reakcji nadkrytycznego szczepienia w obecności ditlenku węgla do struktury octanu celulozy i blendów skrobiowo-chitozanowych. Wykorzystano diizocyjanian heksametylenu jako linker-łącznik do grup hydroksylowych modyfikowanego materiału. W ramach badań dobrano parametry procesowe reakcji szczepienia dla obu polimerów. Zaszczepienie czwartorzędowych związków amoniowych do octanu celulozy i kompozytów polimerowych spowodowało wzrost hydrofobowości materiałów. Materiały uzyskane ze szczepienia octanu celulozy wykazywały właściwości antybiofilmowe w sposób statystycznie istotny względem badanych szczepów. Na wyróżnienie zasługuje materiał CA-QAC 2, do którego nie były w stanie przyłączyć się: *S. aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300, *E. coli* ATCC 10536 i *S. Enteritidis* ATCC 13076. Z racji przyłączenia czwartorzędowych związków amoniowych do struktury polimeru wiązaniem kowalencyjnym możliwe jest uzyskanie antybiofilmowych właściwości materiału.

Zastosowanie metody wysokociśnieniowej z użyciem nadkrytycznego ditlenku węgla pozwoliło na uzyskanie unikalnych materiałów, których produkcja i otrzymane właściwości nie byłyby możliwe przy zastosowaniu metod konwencjonalnych. Wykazano możliwość modyfikacji polimeru w całej jego objętości, co było możliwe ze względu na brak napięcia powierzchniowego użytego medium płynu nadkrytycznego. Otrzymany materiał w drodze impregnacji lub szczepienia nadkrytycznego nie zawierał w sobie rozpuszczalnika organicznego, którego użycie nie jest konieczne w procesach wysokociśnieniowych w przeciwieństwie do metod konwencjonalnych. Z powodu tych czynników, proces modyfikacji materiałów metodą impregnacji i szczepienia nadkrytycznego należy klasyfikować jako bezpieczną alternatywę dla środowiska względem metod konwencjonalnych oraz jako metody wpisujące się w trend tzw. zielonej chemii.

## 5 Bibliografia

- [1] M. Kannan, K. Rajarathinam, S. Venkatesan, B. Dheeba, i A. Maniraj, „Silver Iodide Nanoparticles as an Antibiofilm Agent—A Case Study on Gram-Negative Biofilm-Forming Bacteria”, *Nanostructures for Antimicrobial Therapy: Nanostructures in Therapeutic Medicine Series*, s. 435–456, sty. 2017, doi: 10.1016/B978-0-323-46152-8.00019-6.
- [2] K. Arunasri i S. V. Mohan, „Biofilms: Microbial Life on the Electrode Surface”, *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation*, s. 295–313, sty. 2019, doi: 10.1016/B978-0-444-64052-9.00011-X.
- [3] K. W. K. Lee, S. Periasamy, M. Mukherjee, C. Xie, S. Kjelleberg, i S. A. Rice, „Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm”, *ISME J*, t. 8, nr 4, s. 894–907, kwi. 2014, doi: 10.1038/ismej.2013.194.
- [4] Y. Baek, J. Yu, S.-H. Kim, S. Lee, i J. Yoon, „Effect of surface properties of reverse osmosis membranes on biofouling occurrence under filtration conditions”, *J Memb Sci*, t. 382, nr 1–2, s. 91–99, paź. 2011, doi: 10.1016/j.memsci.2011.07.049.
- [5] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, i P. Stoodley, „Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases”, *Nat Rev Microbiol*, t. 2, nr 2, s. 95–108, luty 2004, doi: 10.1038/nrmicro821.
- [6] M. Burmølle, D. Ren, T. Bjarnsholt, i S. J. Sørensen, „Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?”, *Trends Microbiol*, t. 22, nr 2, s. 84–91, luty 2014, doi: 10.1016/J.TIM.2013.12.004.
- [7] M. Berlanga i R. Guerrero, „Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications”, *Microb Cell Fact*, t. 15, nr 1, s. 165, grudz. 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0569-5.
- [8] D. E. Waturangi, J. P. Hariyanto, W. Lois, R. A. Hutagalung, i J. K. Hwang, „Inhibition of Marine Biofouling by Aquatic Actinobacteria and Coral-Associated Marine Bacteria”, *Malays J Microbiol*, t. 13, nr 2, s. 92–99, cze. 2017, [Online]. Dostępne na: <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=85052401913&partnerID=8YFLogxK>
- [9] Y. M. Wi i R. Patel, „Understanding Biofilms and Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections”, *Infect Dis Clin North Am*, t. 32, nr 4, s. 915–929, grudz. 2018, doi: 10.1016/j.idc.2018.06.009.

- [10] I. Francolini i G. Donelli, „Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections”, *FEMS Immunol Med Microbiol*, t. 59, nr 3, s. 227–238, sie. 2010, doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x.
- [11] A. Bistolfi *i in.*, „Antibiotic-Loaded Cement in Orthopedic Surgery: A Review”, *ISRN Orthop*, t. 2011, s. 1–8, sie. 2011, doi: 10.5402/2011/290851.
- [12] C. Vassena *i in.*, „Photodynamic antibacterial and antibiofilm activity of RLP068/Cl against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* forming biofilms on prosthetic material”, *Int J Antimicrob Agents*, t. 44, nr 1, s. 47–55, lip. 2014, doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2014.03.012.
- [13] J. S. Axford, „Joint and bone infections”, *Medicine*, t. 38, nr 4, s. 194–201, kwi. 2010, doi: 10.1016/j.mpmed.2009.12.006.
- [14] G. Donelli, Red., *Microbial Biofilms*, t. 1147. New York, NY: Springer New York, 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0467-9.
- [15] A. Mahapatra, „Study of Biofilm in Bacteria from Water Pipelines”, *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 2015, doi: 10.7860/JCDR/2015/12415.5715.
- [16] M. A. Rather, K. Gupta, i M. Mandal, „Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies.”, *Braz J Microbiol*, t. 52, nr 4, s. 1701–1718, grudz. 2021, doi: 10.1007/s42770-021-00624-x.
- [17] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, i H. O. Sintim, „Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents”, *Future Med Chem*, t. 7, nr 4, s. 493–512, mar. 2015, doi: 10.4155/fmc.15.6.
- [18] Z. Lewandowski i J. P. Boltz, „Biofilms in Water and Wastewater Treatment”, *Treatise on Water Science*, t. 4, s. 529–570, sty. 2011, doi: 10.1016/B978-0-444-53199-5.00095-6.
- [19] J. S. Vrouwenvelder, D. A. Graf von der Schulenburg, J. C. Kruithof, M. L. Johns, i M. C. M. van Loosdrecht, „Biofouling of spiral-wound nanofiltration and reverse osmosis membranes: A feed spacer problem”, *Water Res*, t. 43, nr 3, s. 583–594, luty 2009, doi: 10.1016/J.WATRES.2008.11.019.
- [20] C. Dreszer, J. S. Vrouwenvelder, A. H. Paulitsch-Fuchs, A. Zwijnenburg, J. C. Kruithof, i H. C. Flemming, „Hydraulic resistance of biofilms”, *J Memb Sci*, t. 429, s. 436–447, luty 2013, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2012.11.030.
- [21] L. Deng *i in.*, „Biofouling and control approaches in membrane bioreactors”, *Bioresour Technol*, t. 221, s. 656–665, grudz. 2016, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2016.09.105.



- [22] J. Hermia, „Blocking Filtration. Application to Non-Newtonian Fluids”, w *Mathematical Models and Design Methods in Solid-Liquid Separation*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1985, s. 83–89. doi: 10.1007/978-94-009-5091-7\_5.
- [23] P. H. Hermans i H. L. Bredée, „Zur Kenntnis der Filtrationsgesetze”, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, t. 54, nr 9, s. 680–700, sty. 1935, doi: 10.1002/recl.19350540902.
- [24] W. R. Bowen, J. I. Calvo, i A. Hernández, „Steps of membrane blocking in flux decline during protein microfiltration”, *J Memb Sci*, t. 101, nr 1–2, s. 153–165, maj 1995, doi: 10.1016/0376-7388(94)00295-A.
- [25] C. Herrero, P. Prádanos, J. I. Calvo, F. Tejerina, i A. Hernández, „Flux Decline in Protein Microfiltration: Influence of Operative Parameters”, *J Colloid Interface Sci*, t. 187, nr 2, s. 344–351, mar. 1997, doi: 10.1006/jcis.1996.4662.
- [26] A. Cirillo, G. Tomaiuolo, i S. Guido, „Membrane Fouling Phenomena in Microfluidic Systems: From Technical Challenges to Scientific Opportunities”, *Micromachines (Basel)*, t. 12, nr 7, s. 820, lip. 2021, doi: 10.3390/mi12070820.
- [27] R. W. Field i J. J. Wu, „Modelling of permeability loss in membrane filtration: Re-examination of fundamental fouling equations and their link to critical flux”, *Desalination*, t. 283, 2011, doi: 10.1016/j.desal.2011.04.035.
- [28] R. W. Field, D. Wu, J. A. Howell, i B. B. Gupta, „Critical flux concept for microfiltration fouling”, *J Memb Sci*, t. 100, nr 3, 1995, doi: 10.1016/0376-7388(94)00265-Z.
- [29] L. McKeen, „The effect of heat aging on the properties of sustainable polymers”, w *The Effect of Long Term Thermal Exposure on Plastics and Elastomers*, Elsevier, 2021, s. 313–332. doi: 10.1016/B978-0-323-85436-8.00001-1.
- [30] P. Tyagi, N. P. Rumjit, S. Garg, S. Ahmed, i C. W. Lai, „Biobased materials for increasing the shelf life of food products”, w *Advanced Applications of Biobased Materials*, Elsevier, 2023, s. 231–243. doi: 10.1016/B978-0-323-91677-6.00031-3.
- [31] U.S. Department of Health and Human Services, „Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Cellulose acetate (packaging) and Ethyl cellulose (packaging)”, <https://wayback.archive-it.org/7993/20171031061136/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm261248.htm>.
- [32] S. Paunonen, „Strength and Barrier Enhancements of Cellophane and Cellulose Derivative Films: A Review”, *Bioresources*, t. 8, nr 2, kwi. 2013, doi: 10.15376/biores.8.2.3098-3121.

- [33] J. Puls, S. A. Wilson, i D. Hölder, „Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review”, *J Polym Environ*, t. 19, nr 1, s. 152–165, mar. 2011, doi: 10.1007/s10924-010-0258-0.
- [34] T. Shibata, „5.6 Cellulose acetate in separation technology”, *Macromol Symp*, t. 208, nr 1, s. 353–370, mar. 2004, doi: 10.1002/masy.200450415.
- [35] C. A. Scholes, G. W. Stevens, i S. E. Kentish, „Membrane gas separation applications in natural gas processing”, *Fuel*, t. 96, s. 15–28, cze. 2012, doi: 10.1016/J.FUEL.2011.12.074.
- [36] M. Fornazier, P. Gontijo de Melo, D. Pasquini, H. Otaguro, G. C. S. Pompêu, i R. Ruggiero, „Additives Incorporated in Cellulose Acetate Membranes to Improve Its Performance as a Barrier in Periodontal Treatment”, *Frontiers in Dental Medicine*, t. 2, grudz. 2021, doi: 10.3389/fdmed.2021.776887.
- [37] A. M. Pandele *i in.*, „Cellulose acetate membranes functionalized with resveratrol by covalent immobilization for improved osseointegration”, *Appl Surf Sci*, t. 438, s. 2–13, kwi. 2018, doi: 10.1016/j.apsusc.2017.11.102.
- [38] Y. Liu, Q. Wang, Y. Lu, H. Deng, i X. Zhou, „Synergistic enhancement of cytotoxicity against cancer cells by incorporation of rectorite into the paclitaxel immobilized cellulose acetate nanofibers”, *Int J Biol Macromol*, t. 152, s. 672–680, cze. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.184.
- [39] R. Konwarh, N. Karak, i M. Misra, „Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications”, *Biotechnol Adv*, t. 31, nr 4, s. 421–437, lip. 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.002.
- [40] S. Negoro *i in.*, „Structural and functional characterization of nylon hydrolases”, *Methods Enzymol*, t. 648, s. 357–389, sty. 2021, doi: 10.1016/BS.MIE.2020.11.004.
- [41] S. Ebnesajjad i R. A. Morgan, „Fluorinated Additives for Plastics”, *Fluoropolymer Additives*, s. 107–148, sty. 2012, doi: 10.1016/B978-1-4377-3461-4.00007-6.
- [42] R. Rulken i C. Koning, „Chemistry and Technology of Polyamides”, *Polymer Science: a Comprehensive Reference: Volume 1-10*, t. 1–10, s. 431–467, sty. 2012, doi: 10.1016/B978-0-444-53349-4.00147-3.
- [43] J. Cao *i in.*, „Novel anti-fouling polyethersulfone/polyamide 66 membrane preparation for air filtration by electrospinning”, *Mater Lett*, t. 192, s. 12–16, kwi. 2017, doi: 10.1016/J.MATLET.2017.01.037.

- [44] B. Zhou, F. Huang, C. Gao, i L. Xue, „The role of ring opening reaction chemistry of sultones/lactones in the direct zwitterionization of polyamide nano-filtration membranes”, *J Memb Sci*, t. 641, s. 119918, sty. 2022, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2021.119918.
- [45] Y. Peng *i in.*, „Plant tannin modified chitosan microfibers for efficient adsorptive removal of Pb<sup>2+</sup> at low concentration”, *Ind Crops Prod*, t. 168, s. 113608, wrz. 2021, doi: 10.1016/J.INDCROP.2021.113608.
- [46] X. Ding, L. Zhao, I. M. Khan, L. Yue, Y. Zhang, i Z. Wang, „Emerging chitosan grafted essential oil components: A review on synthesis, characterization, and potential application”, *Carbohydr Polym*, t. 297, s. 120011, grudz. 2022, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2022.120011.
- [47] X. Yang, W. Lan, i X. Sun, „Antibacterial and antioxidant properties of phenolic acid grafted chitosan and its application in food preservation: A review”, *Food Chem*, t. 428, s. 136788, grudz. 2023, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2023.136788.
- [48] *Chitin and Chitosan*. Elsevier, 2022. doi: 10.1016/C2021-0-01801-0.
- [49] J. Jacob, S. Loganathan, i S. Thomas, Red., *Chitin- and Chitosan-Based Biocomposites for Food Packaging Applications*. CRC Press, 2020. doi: 10.1201/9780429299605.
- [50] B. Zhao *i in.*, „Progress and prospects of modified starch-based carriers in anticancer drug delivery”, *Journal of Controlled Release*, t. 349, s. 662–678, wrz. 2022, doi: 10.1016/J.JCONREL.2022.07.024.
- [51] J. BeMiller i R. Whistler, Red., *Starch: Chemistry and Technology*, Third edition. Elsevier, 2009. doi: 10.1016/S1082-0132(08)X0009-3.
- [52] E. Šárka i V. Dvořáček, „New processing and applications of waxy starch (a review)”, *J Food Eng*, t. 206, s. 77–87, sie. 2017, doi: 10.1016/J.JFOODENG.2017.03.006.
- [53] E. Šárka, A. Sinica, P. Smrčková, i M. Sluková, „Non-Traditional Starches, Their Properties, and Applications”, *Foods*, t. 12, nr 20, s. 3794, paź. 2023, doi: 10.3390/foods12203794.
- [54] B. Berche, M. Henkel, i R. Kenna, „Fenômenos críticos: 150 anos desde Cagniard de la Tour”, *Revista Brasileira de Ensino de Física*, t. 31, nr 2, s. 2602.1-2602.4, cze. 2009, doi: 10.1590/S1806-11172009000200015.
- [55] Thomas Andrews, „On the continuity of the gaseous and liquid states of matter”, *Philos Trans R Soc Lond*, t. 159, s. 575–590, grudz. 1869, doi: 10.1098/rstl.1869.0021.

- [56] E. D. Ramsey, W. Guo, J. Y. Liu, i X. H. Wu, „Supercritical Fluids”, *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, t. 2, s. 1007–1026, sty. 2011, doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00152-5.
- [57] M. Goto, R. Askin, i M. Sasaki, „Supercritical Fluid Extraction in Food Analysis”, w *Handbook of Food Analysis Instruments*, CRC Press, 2008. doi: 10.1201/9781420045673.ch3.
- [58] „Gas and Supercritical Fluid Chromatography”, <https://www.slideserve.com/osmond/gas-and-supercritical-fluid-chromatography>. Dostęp 18.04.2024
- [59] M. Goto, R. Askin, i M. Sasaki, „Supercritical Fluid Extraction in Food Analysis”, w *Handbook of Food Analysis Instruments*, CRC Press, 2008. doi: 10.1201/9781420045673.ch3.
- [60] D. Stojanovic i in., „Preparation of MEMO silane-coated SiO<sub>2</sub> nanoparticles under high pressure of carbon dioxide and ethanol”, *J Supercrit Fluids*, t. 52, nr 3, s. 276–284, kwi. 2010, doi: 10.1016/j.supflu.2010.02.004.
- [61] Ž. Knez i C. Lütge, *Product, Process and Plant Design Using Subcritical and Supercritical Fluids for Industrial Application*. Cham: Springer International Publishing, 2023. doi: 10.1007/978-3-031-34636-1.
- [62] P. Khuwijtjaru, N. Milasing, i S. Adachi, „Production of D-tagatose: A review with emphasis on subcritical fluid treatment”, *Science, Engineering and Health Studies*, t. 12, nr 3, s. 159–167, 2018.
- [63] M. M. Rahman, J. Dongxu, M. S. Beni, H. C. Hei, W. He, i J. Zhao, „Supercritical water heat transfer for nuclear reactor applications: A review”, *Ann Nucl Energy*, t. 97, s. 53–65, lis. 2016, doi: 10.1016/J.ANUCENE.2016.06.022.
- [64] M. L. Corradini, „Transport Phenomena in Supercritical Fluids in Gen-IV Reactor Designs”, *Nucl Technol*, t. 167, nr 1, s. 145–156, lip. 2009, doi: 10.13182/NT09-A8858.
- [65] C. Rodriguez Correa i A. Kruse, „Supercritical water gasification of biomass for hydrogen production – Review”, *J Supercrit Fluids*, t. 133, s. 573–590, mar. 2018, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2017.09.019.
- [66] K. Heeley, R. L. Orozco, L. E. Macaskie, J. Love, i B. Al-Duri, „Supercritical water gasification of microalgal biomass for hydrogen production-A review”, *Int J Hydrogen Energy*, t. 49, s. 310–336, sty. 2024, doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2023.08.081.
- [67] Ž. Knez, E. Markočič, M. Leitgeb, M. Primožič, M. Knez Hrnčič, i M. Škerget, „Industrial applications of supercritical fluids: A review”, *Energy*, t. 77, s. 235–243, grudz. 2014, doi: 10.1016/j.energy.2014.07.044.

- [68] E. Weidner, „Impregnation via supercritical CO<sub>2</sub>—What we know and what we need to know”, *J Supercrit Fluids*, t. 134, s. 220–227, kwi. 2018, doi: 10.1016/j.supflu.2017.12.024.
- [69] I. Medina, „Determination of diffusion coefficients for supercritical fluids”, *J Chromatogr A*, t. 1250, s. 124–140, sie. 2012, doi: 10.1016/J.CHROMA.2012.04.052.
- [70] S. Lee, J. Lee, Y. Kim, S. Jeong, D. E. Kim, i G. Yun, „Quasi-equilibrium phase coexistence in single component supercritical fluids”, *Nat Commun*, t. 12, nr 1, s. 4630, lip. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-24895-y.
- [71] J. Shi *i in.*, „Supercritical CO<sub>2</sub>-applied equipment for chemical synthesis and transformation: Current status and perspectives”, *Chemical Engineering Journal*, t. 459, s. 141608, mar. 2023, doi: 10.1016/J.CEJ.2023.141608.
- [72] J. P. Lockwood, Richard W. Hazlett, i Servando de la Cruz-Reyna, *Volcanoes: global perspectives*, 2nd wyd. John Wiley & Sons, 2022.
- [73] „«Impregnation.» Vocabulary.com Dictionary, Vocabulary.com, <https://www.vocabulary.com/dictionary/impregnation>. ”.Dostęp 16.04.2024
- [74] F. F. Legusha, A. S. Pavlovsky, S. I. Pugachev, E. J. Rytov, i N. G. Semenova, „Acoustical wood impregnation”, *Marine Intellectual Technologies*, t. 3, nr 4, s. 55–64, 2017.
- [75] I. Zizovic, „Supercritical Fluid Applications in the Design of Novel Antimicrobial Materials”, *Molecules*, t. 25, nr 11, s. 2491, maj 2020, doi: 10.3390/molecules25112491.
- [76] I. Kikic i F. Vecchione, „Supercritical impregnation of polymers”, *Curr Opin Solid State Mater Sci*, t. 7, nr 4–5, s. 399–405, sie. 2003, doi: 10.1016/j.cossms.2003.09.001.
- [77] S. Milovanovic *i in.*, „High pressure modified cotton in wound dressing applications”, *Cotton Fibers: Characteristics, Uses and Performance*. Nova Science Publishers, New York, s. 177–207, 2017.
- [78] S. Milovanovic, M. Stamenic, D. Markovic, M. Radetic, i I. Zizovic, „Solubility of thymol in supercritical carbon dioxide and its impregnation on cotton gauze”, *J Supercrit Fluids*, t. 84, s. 173–181, grudz. 2013, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2013.10.003.
- [79] U. S. Food, D. Administration, i others, „Centre for Food Safety and Applied Nutrition”, *Office of Food Additive Safety, Guidance for Industry, Preparation of Food Contact Notifications for Food Contact Substances: Toxicological Recommendations, Final Guidance*, 2002.

- [80] E. Parliament i Council, „Regulation (EC) No 2232/96 the European Parliament, and of the Council on 28 October 1996, Commission Decision of 23 February 1999 adopting a register of flavouring substances used in or on foodstuffs”, *Official Journal of the European Communities*, s. 1–37, 1996.
- [81] S. Milovanovic, T. Adamovic, K. Aksentijevic, D. Misic, J. Ivanovic, i I. Zizovic, „Cellulose Acetate Based Material with Antibacterial Properties Created by Supercritical Solvent Impregnation”, 2017, doi: 10.1155/2017/8762649.
- [82] I. Zizovic *i in.*, „Utilization of supercritical carbon dioxide in fabrication of cellulose acetate films with anti-biofilm effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*”, *J Supercrit Fluids*, t. 140, s. 11–20, paź. 2018, doi: 10.1016/j.supflu.2018.05.025.
- [83] C. Villegas *i in.*, „Supercritical impregnation of cinnamaldehyde into polylactic acid as a route to develop antibacterial food packaging materials”, *Food Research International*, t. 99, s. 650–659, wrz. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.06.031.
- [84] V. G. Correia, A. M. Ferraria, M. G. Pinho, i A. Aguiar-Ricardo, „Antimicrobial Contact-Active Oligo(2-oxazoline)s-Grafted Surfaces for Fast Water Disinfection at the Point-of-Use”, *Biomacromolecules*, t. 16, nr 12, s. 3904–3915, grudz. 2015, doi: 10.1021/acs.biomac.5b01243.
- [85] I. Smirnova, S. Suttiruengwong, i W. Arlt, „Feasibility study of hydrophilic and hydrophobic silica aerogels as drug delivery systems”, *J Non Cryst Solids*, t. 350, s. 54–60, grudz. 2004, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2004.06.031.
- [86] C. A. García-González, M. Alnaief, i I. Smirnova, „Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems”, *Carbohydr Polym*, t. 86, nr 4, s. 1425–1438, paź. 2011, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2011.06.066.
- [87] S. Milovanovic, I. Jankovic-Castvan, J. Ivanovic, i I. Zizovic, „Effect of starch xero- and aerogels preparation on the supercritical CO<sub>2</sub> impregnation of thymol”, *Starch - Stärke*, t. 67, nr 1–2, s. 174–182, sty. 2015, doi: 10.1002/star.201400134.
- [88] E. J. S. Araujo, E. Scopel, C. A. Rezende, i J. Martínez, „Supercritical impregnation of polyphenols from passion fruit residue in corn starch aerogels: Effect of operational parameters”, *J Food Eng*, t. 343, s. 111394, kwi. 2023, doi: 10.1016/J.JFOODENG.2022.111394.
- [89] T. Abou Elmaaty, J. Ma, F. El-Taweel, E. Abd El-Aziz, i S. Okubayashi, „Facile Bifunctional Dyeing of Polyester under Supercritical Carbon Dioxide Medium with New Antibacterial Hydrazono Propanenitrile Dyes”, *Ind Eng Chem Res*, t. 53, nr 40, s. 15566–15570, paź. 2014, doi: 10.1021/ie502088r.

- [90] A. Torres, J. Romero, A. Macan, A. Guarda, i M. J. Galotto, „Near critical and supercritical impregnation and kinetic release of thymol in LLDPE films used for food packaging”, *J Supercrit Fluids*, t. 85, s. 41–48, sty. 2014, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2013.10.011.
- [91] J. Pajnik *i in.*, „Application of Supercritical Solvent Impregnation for Production of Zeolite Modified Starch-Chitosan Polymers with Antibacterial Properties”, *Molecules*, t. 25, nr 20, s. 4717, paź. 2020, doi: 10.3390/molecules25204717.
- [92] A. W. Kjellow i O. Henriksen, „Supercritical wood impregnation”, *J Supercrit Fluids*, t. 50, nr 3, s. 297–304, paź. 2009, doi: 10.1016/j.supflu.2009.06.013.
- [93] S. Iversen, T. Larsen, O. Henriksen, i K. Felsvang, „The world’s first commercial supercritical wood treatment plant”, mar. 2003.
- [94] K. C. Wood, A. W. Kjellow, M. J. Konkler, G. Presley, i J. J. Morrell, „Preservative treatment of tasmanian plantation *Eucalyptus nitens* using supercritical fluids”, *Wood and Fiber Science*, t. 55, nr 1, s. 83–93, lip. 2023, doi: 10.22382/wfs-2023-08.
- [95] C. R. S. de Oliveira, P. V. de Oliveira, L. Pellenz, C. R. L. de Aguiar, i A. H. da Silva Júnior, „Supercritical fluid technology as a sustainable alternative method for textile dyeing: An approach on waste, energy, and CO<sub>2</sub> emission reduction”, *Journal of Environmental Sciences*, t. 140, s. 123–145, cze. 2024, doi: 10.1016/J.JES.2023.06.007.
- [96] A. Azzouz, „Achievement in hydrogen storage on adsorbents with high surface-to-bulk ratio – Prospects for Si-containing matrices”, *Int J Hydrogen Energy*, t. 37, nr 6, s. 5032–5049, mar. 2012, doi: 10.1016/J.IJHYDENE.2011.12.024.
- [97] Brown P.J. i Stevens K., Red., *Nanofibers and Nanotechnology in Textiles*, 1. wyd. Woodhead Publishing Ltd, 2007.
- [98] E.-R. Kenawy, S. D. Worley, i R. Broughton, „The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review”, *Biomacromolecules*, t. 8, nr 5, s. 1359–1384, maj 2007, doi: 10.1021/bm061150q.
- [99] M. A. Fanovich i P. Jaeger, „Sorption and diffusion of compressed carbon dioxide in polycaprolactone for the development of porous scaffolds”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 32, nr 4, s. 961–968, maj 2012, doi: 10.1016/J.MSEC.2012.02.021.
- [100] M. Tyrka *i in.*, „Cellulose Acetate Membranes Modification by Aminosilane Grafting in Supercritical Carbon Dioxide towards Antibiofilm Properties”, *Membranes (Basel)*, t. 12, nr 1, 2022, doi: 10.3390/membranes12010033.

- [101] W. Z. Xu, L. Yang, i P. A. Charpentier, „Preparation of Antibacterial Softwood via Chemical Attachment of Quaternary Ammonium Compounds Using Supercritical CO<sub>2</sub>”, *ACS Sustain Chem Eng*, t. 4, nr 3, 2016, doi: 10.1021/acssuschemeng.5b01488.
- [102] A. Lipińska-Ojrzanowska i J. Walusiak-Skorupa, „Quaternary ammonium compounds – new occupational hazards”, *Med Pr*, grudz. 2014, doi: 10.13075/mp.5893.00056.
- [103] M. B. Yagci, S. Bolca, J. P. A. Heuts, W. Ming, i G. De With, „Self-stratifying antimicrobial polyurethane coatings”, *Prog Org Coat*, t. 72, nr 3, s. 305–314, lis. 2011, doi: 10.1016/J.PORGCOAT.2011.04.021.
- [104] E. A. Saverina, N. A. Frolov, O. A. Kamanina, V. A. Arlyapov, A. N. Vereshchagin, i V. P. Ananikov, „From Antibacterial to Antibiofilm Targeting: An Emerging Paradigm Shift in the Development of Quaternary Ammonium Compounds (QACs)”, *ACS Infect Dis*, t. 9, nr 3, s. 394–422, mar. 2023, doi: 10.1021/acsinfecdis.2c00469.
- [105] M. Nowak, D. Semba, D. Misic, T. Półbrat, D. Stojanovic, A. Trusek, I. Zizovic, “Cellulose Acetate Modification Towards Antibiofilm Properties via Chemical Attachment of Quaternary Ammonium Compounds Using Supercritical CO<sub>2</sub>”; 13th International Symposium on Supercritical Fluids Montreal, 15-18 May 2022, oral presentation. <https://supercriticalfluidsociety.net/wp-content/ISSF2022/pdf/O-35.pdf>; <https://supercriticalfluidsociety.net/wp-content/ISSF2022/dir/ISSF2022OAUT.htm>
- [106] R. Kumar, R. Kr. Sharma, i A. P. Singh, „Grafted cellulose: a bio-based polymer for durable applications”, *Polymer Bulletin*, t. 75, nr 5, s. 2213–2242, maj 2018, doi: 10.1007/s00289-017-2136-6.
- [107] A. Celli, M. W. Sabaa, A. N. Jyothi, i S. Kalia, „Chitosan and Starch-Based Hydrogels Via Graft Copolymerization”, 2016, s. 189–234. doi: 10.1007/978-3-319-25322-0\_8.
- [108] S. Hansson *i in.*, „Grafting Efficiency of Synthetic Polymers onto Biomaterials: A Comparative Study of Grafting- *from* versus Grafting- *to*”, *Biomacromolecules*, t. 14, nr 1, s. 64–74, sty. 2013, doi: 10.1021/bm3013132.
- [109] A. A. Aly i M. K. El-Bisi, „Grafting of Polysaccharides”, w *Biopolymer Grafting: Synthesis and Properties*, Elsevier, 2018, s. 469–519. doi: 10.1016/B978-0-323-48104-5.00011-1.
- [110] S. Kalia i M. W. Sabaa, Red., *Polysaccharide Based Graft Copolymers*, 1. wyd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-36566-9.



- [111] A. Anitha, N. S. Rejinold, J. D. Bumgardner, S. V. Nair, i R. Jayakumar, „Approaches for Functional Modification or Cross-Linking of Chitosan”, w *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals*, Wiley, 2012, s. 107–124. doi: 10.1002/9781119962977.ch7.
- [112] C. Alvarez-Lorenzo, B. Blanco-Fernandez, A. M. Puga, i A. Concheiro, „Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery”, *Adv Drug Deliv Rev*, t. 65, nr 9, s. 1148–1171, sie. 2013, doi: 10.1016/J.ADDR.2013.04.016.
- [113] J. C. Quintanilla de Stéfano, V. Abundis-Correa, S. D. Herrera-Flores, i A. J. Alvarez, „pH-Sensitive Starch-Based Hydrogels: Synthesis and Effect of Molecular Components on Drug Release Behavior”, *Polymers (Basel)*, t. 12, nr 9, s. 1974, sie. 2020, doi: 10.3390/polym12091974.
- [114] I. S. Bayer, „Controlled Drug Release from Nanoengineered Polysaccharides”, *Pharmaceutics*, t. 15, nr 5, s. 1364, kwi. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15051364.
- [115] C. Chang, B. Duan, J. Cai, i L. Zhang, „Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery”, *Eur Polym J*, t. 46, nr 1, s. 92–100, sty. 2010, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2009.04.033.
- [116] L. Jabbour, C. Gerbaldi, D. Chaussy, E. Zeno, S. Bodoardo, i D. Beneventi, „Microfibrillated cellulose–graphite nanocomposites for highly flexible paper-like Li-ion battery electrodes”, *J Mater Chem*, t. 20, nr 35, s. 7344, 2010, doi: 10.1039/c0jm01219j.
- [117] L. Wei, C. Chen, Z. Hou, i H. Wei, „Poly (acrylic acid sodium) grafted carboxymethyl cellulose as a high performance polymer binder for silicon anode in lithium ion batteries”, *Sci Rep*, t. 6, nr 1, s. 19583, sty. 2016, doi: 10.1038/srep19583.
- [118] A. Roy, B. Adhikari, i S. B. Majumder, „Equilibrium, Kinetic, and Thermodynamic Studies of Azo Dye Adsorption from Aqueous Solution by Chemically Modified Lignocellulosic Jute Fiber”, *Ind Eng Chem Res*, t. 52, nr 19, s. 6502–6512, maj 2013, doi: 10.1021/ie400236s.
- [119] K. E. Lee, T. T. Teng, N. Morad, B. T. Poh, i M. Mahalingam, „Flocculation activity of novel ferric chloride–polyacrylamide (FeCl<sub>3</sub>-PAM) hybrid polymer”, *Desalination*, t. 266, nr 1–3, s. 108–113, sty. 2011, doi: 10.1016/j.desal.2010.08.009.
- [120] A. Mudhoo, V. K. Garg, i S. Wang, „Removal of heavy metals by biosorption”, *Environ Chem Lett*, t. 10, nr 2, s. 109–117, cze. 2012, doi: 10.1007/s10311-011-0342-2.
- [121] G. S. Chauhan, S. Mahajan, i L. K. Guleria, „Polymers from renewable resources: sorption of Cu<sup>2+</sup> ions by cellulose graft copolymers”, *Desalination*, t. 130, nr 1, s. 85–88, wrz. 2000, doi: 10.1016/S0011-9164(00)00076-X.

- [122] D. Zhang i H. Xiao, „Dual-Functional Beeswaxes on Enhancing Antimicrobial Activity and Water Vapor Barrier Property of Paper”, *ACS Appl Mater Interfaces*, t. 5, nr 8, s. 3464–3468, kwi. 2013, doi: 10.1021/am400585m.
- [123] R. Tankhiwale i S. K. Bajpai, „Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, t. 69, nr 2, s. 164–168, mar. 2009, doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.11.004.
- [124] Y. Wu i in., „Green and biodegradable composite films with novel antimicrobial performance based on cellulose”, *Food Chem*, t. 197, s. 250–256, kwi. 2016, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.127.
- [125] C. Dong, L. Y. Qian, G. L. Zhao, B. H. He, i H. N. Xiao, „Preparation of antimicrobial cellulose fibers by grafting  $\beta$ -cyclodextrin and inclusion with antibiotics”, *Mater Lett*, t. 124, s. 181–183, cze. 2014, doi: 10.1016/J.MATLET.2014.03.091.
- [126] G. Bolton, D. LaCasse, i R. Kuriyel, „Combined models of membrane fouling: Development and application to microfiltration and ultrafiltration of biological fluids”, *J Memb Sci*, t. 277, nr 1–2, s. 75–84, cze. 2006, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2004.12.053.
- [127] S. T. D. De Barros, C. M. G. Andrade, E. S. Mendes, i L. Peres, „Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration”, *J Memb Sci*, t. 215, nr 1–2, s. 213–224, kwi. 2003, doi: 10.1016/S0376-7388(02)00615-4.
- [128] K. Orihashi i T. Ueda, „“De-airing” in open heart surgery: report from the CVSAP nation-wide survey and literature review”, *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, t. 67, nr 10, s. 823–834, 2019, doi: 10.1007/s11748-019-01168-6.
- [129] J. Nyman, P. Svenarud, i J. van der Linden, „Carbon dioxide de-airing in minimal invasive cardiac surgery, a new effective device”, *J Cardiothorac Surg*, t. 14, nr 1, s. 12, 2019, doi: 10.1186/s13019-018-0824-4.
- [130] M. Persson i J. van der Linden, „Wound ventilation with carbon dioxide: a simple method to prevent direct airborne contamination during cardiac surgery?”, *Journal of Hospital Infection*, t. 56, nr 2, s. 131–136, luty 2004, doi: 10.1016/J.JHIN.2003.10.013.
- [131] M. Persson, J. I. Flock, i J. van der Linden, „Antiseptic wound ventilation with a gas diffuser: a new intraoperative method to prevent surgical wound infection?”, *Journal of Hospital Infection*, t. 54, nr 4, s. 294–299, sie. 2003, doi: 10.1016/S0195-6701(03)00135-X.

- [132] M. Baumann i J. E. Cater, „The Effect of Heated CO<sub>2</sub> Insufflation in Minimising Surgical Wound Contamination During Open Surgery”, *Ann Biomed Eng*, t. 46, nr 8, s. 1101–1111, 2018, doi: 10.1007/s10439-018-2034-6.
- [133] G. Donelli, *Microbial Biofilms, Methods and Protocols Edited*. 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0467-9.
- [134] „ISO 7218; Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff—General Rules for Microbiological Examinations”, *ISO 7218:1996/Amd.1:2001(E)*, t. AMENDMENT 1. Geneva, Switzerland, 2001.
- [135] M. Nowak *i in.*, „The transformation of cellulose acetate into a new biocidal polymer by effluent-free grafting in supercritical carbon dioxide”, *J Supercrit Fluids*, t. 202, s. 106058, lis. 2023, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2023.106058.
- [136] S. Milovanovic, D. Markovic, K. Aksentijevic, D. B. Stojanovic, J. Ivanovic, i I. Zizovic, „Application of cellulose acetate for controlled release of thymol”, *Carbohydr Polym*, t. 147, s. 344–353, sie. 2016, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2016.03.093.
- [137] V. Obradovic *i in.*, „Electrospun poly (vinylbutyral)/silica composite fibres for impregnation of aramid fabrics”, *Material Plastic*, t. 51, nr 3, s. 319–322, 2014.
- [138] D. A. Cerqueira, G. Rodrigues Filho, i R. M. N. Assunção, „A New Value for the Heat of Fusion of a Perfect Crystal of Cellulose Acetate”, *Polymer Bulletin*, t. 56, nr 4–5, s. 475–484, mar. 2006, doi: 10.1007/s00289-006-0511-9.
- [139] M. Sousa *i in.*, „Dynamical Characterization of a Cellulose Acetate Polysaccharide”, *J Phys Chem B*, t. 114, nr 34, s. 10939–10953, wrz. 2010, doi: 10.1021/jp101665h.
- [140] M. Nowak *i in.*, „The antimicrobial substance’s content influences the membrane blocking mechanism in cross-flow filtration – Flow cytometric assessment of the membrane’s activity”, *Journal of Water Process Engineering*, t. 56, s. 104371, grudz. 2023, doi: 10.1016/J.JWPE.2023.104371.
- [141] M. Nowak *i in.*, „Polymeric Microfiltration Membranes Modification by Supercritical Solvent Impregnation-Potential Application in Open Surgical Wound Ventilation”, 2021, doi: 10.3390/molecules26154572.
- [142] T. Adamovic, S. Milovanovic, D. Markovic, i I. Zizovic, „Impregnation of cellulose acetate films with carvacrol using supercritical carbon dioxide”, *Tehnika*, t. 73, nr 1, s. 19–25, 2018, doi: 10.5937/tehnika1801017A.

- [143] I. Zizovic, A. Trusek, M. Tyrka, I. Moric, i L. Senerovic, „Functionalization of polyamide microfiltration membranes by supercritical solvent impregnation”, *J Supercrit Fluids*, t. 174, s. 105250, sie. 2021, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2021.105250.
- [144] D. Marković, S. Milovanović, K. De Clerck, I. Zizovic, D. Stojanović, i M. Radetić, „Development of material with strong antimicrobial activity by high pressure CO<sub>2</sub> impregnation of polyamide nanofibers with thymol”, *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, t. 26, s. 19–27, lip. 2018, doi: 10.1016/J.JCOU.2018.04.019.
- [145] G. A. Leeke, R. Santos, i M. B. King, „Vapor–Liquid Equilibria for the Carbon Dioxide + Carvacrol System at Elevated Pressures”, *J Chem Eng Data*, t. 46, nr 3, s. 541–545, 2001, doi: 10.1021/je000342k.
- [146] A. Rojas, A. Torres, J. Galotto, A. Guarda, i R. Julio, „Supercritical impregnation for food applications: a review of the effect of the operational variables on the active compound loading”, 2019, doi: 10.1080/10408398.2019.1567459.
- [147] J. Dubois, E. Grau, T. Tassaing, i M. Dumon, „On the CO<sub>2</sub> sorption and swelling of elastomers by supercritical CO<sub>2</sub> as studied by in situ high pressure FTIR microscopy”, *J Supercrit Fluids*, t. 131, s. 150–156, sty. 2018, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2017.09.003.
- [148] B. Bonavoglia, G. Storti, M. Morbidelli, A. Rajendran, i M. Mazzotti, „Sorption and swelling of semicrystalline polymers in supercritical CO<sub>2</sub>”, *J Polym Sci B Polym Phys*, t. 44, nr 11, s. 1531–1546, 2006, doi: <https://doi.org/10.1002/polb.20799>.
- [149] I. Zizovic i in., „Functional Modification of Cellulose Acetate Microfiltration Membranes by Supercritical Solvent Impregnation”, 2021, doi: 10.3390/molecules.
- [150] M. Bertuola, N. Fagali, i M. Fernández Lorenzo de Mele, „Detection of carvacrol in essential oils by electrochemical polymerization”, *Heliyon*, t. 6, nr 4, s. e03714, kwi. 2020, doi: 10.1016/J.HELIYON.2020.E03714.
- [151] A. C. S. Valderrama, G. C. R. De, A. C. S. Valderrama, i G. C. R. De, „Traceability of Active Compounds of Essential Oils in Antimicrobial Food Packaging Using a Chemometric Method by ATR-FTIR”, *Am J Analyt Chem*, t. 8, nr 11, s. 726–741, lis. 2017, doi: 10.4236/AJAC.2017.811053.
- [152] H. Schulz, R. Quilitzsch, i H. Krüger, „Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy”, *J Mol Struct*, t. 661–662, nr 1–3, s. 299–306, grudz. 2003, doi: 10.1016/S0022-2860(03)00517-9.

- [153] E. S. Lopes *i in.*, „The role of intermolecular interactions in polyaniline/polyamide-6,6 pressure-sensitive blends studied by DFT and <sup>1</sup>H NMR”, *Eur Polym J*, t. 85, s. 588–604, grudz. 2016, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2016.11.011.
- [154] D. Pavličák, J. Hnilica, A. Quade, J. Schäfer, M. Alberti, i V. Kudrle, „Functionalisation and pore size control of electrospun PA6 nanofibres using a microwave jet plasma”, *Polym Degrad Stab*, t. 108, s. 48–55, paź. 2014, doi: 10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2014.05.027.
- [155] M. Sadeghi-Kiakhani i S. Safapour, „Improvement of dyeing and antimicrobial properties of nylon fabrics modified using chitosan-poly(propylene imine) dendreimer hybrid”, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, t. 33, s. 170–177, sty. 2016, doi: 10.1016/J.JIEC.2015.09.034.
- [156] E. H. Acero *i in.*, „Two-step enzymatic functionalisation of polyamide with phenolics”, *J Mol Catal B Enzym*, t. 79, s. 54–60, lip. 2012, doi: 10.1016/J.MOLCATB.2012.03.019.
- [157] S. G. Kazarian i G. G. Martirosyan, „Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR–IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP”, *Int J Pharm*, t. 232, nr 1–2, s. 81–90, sty. 2002, doi: 10.1016/S0378-5173(01)00905-X.
- [158] M. Arnaudov, B. Ivanova, i S. Dinkov, „A reducing-difference IR-spectral study of 4-aminopyridine”, t. 2, nr 4, s. 589–597, 2004, doi: doi:10.2478/BF02482723.
- [159] G. Espinosa-Acosta *i in.*, „Stability Analysis of Anthocyanins Using Alcoholic Extracts from Black Carrot (*Daucus Carota* ssp. *Sativus* Var. *Atrorubens* Alef.)”, *Molecules*, t. 23, nr 11, 2018, doi: 10.3390/molecules23112744.
- [160] S. Milovanovic, D. Markovic, K. Aksentijevic, D. B. Stojanovic, J. Ivanovic, i I. Zizovic, „Application of cellulose acetate for controlled release of thymol”, *Carbohydr Polym*, t. 147, s. 344–353, sie. 2016, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2016.03.093.
- [161] S. Milovanovic, M. Stamenic, D. Markovic, J. Ivanovic, i I. Zizovic, „Supercritical impregnation of cellulose acetate with thymol”, *J Supercrit Fluids*, t. 97, s. 107–115, luty 2015, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2014.11.011.
- [162] M. Baumann i J. E. Cater, „The Effect of Heated CO<sub>2</sub> Insufflation in Minimising Surgical Wound Contamination During Open Surgery”, *Ann Biomed Eng*, t. 46, 2034, doi: 10.1007/s10439-018-2034-6.
- [163] M. Zafar, M. Ali, S. M. Khan, T. Jamil, i M. T. Z. Butt, „Effect of additives on the properties and performance of cellulose acetate derivative membranes in the separation of isopropanol/water mixtures”, *Desalination*, t. 285, s. 359–365, sty. 2012, doi: 10.1016/J.DESAL.2011.10.027.

- [164] H. Kamal, F. M. Abd-Elrahim, i S. Lotfy, „Characterization and some properties of cellulose acetate-co-polyethylene oxide blends prepared by the use of gamma irradiation”, *J Radiat Res Appl Sci*, t. 7, nr 2, s. 146–153, kwi. 2014, doi: 10.1016/J.JRRAS.2014.01.003.
- [165] F. Sabeti Dehkordi, M. Pakizeh, i M. Namvar-Mahboub, „Properties and ultrafiltration efficiency of cellulose acetate/organically modified Mt (CA/OMMt) nanocomposite membrane for humic acid removal”, *Appl Clay Sci*, t. 105–106, s. 178–185, mar. 2015, doi: 10.1016/J.CLAY.2014.11.042.
- [166] C. C. Darpentigny *i in.*, „Antibacterial Cellulose Nanopapers via Aminosilane Grafting in Supercritical Carbon Dioxide”, *Cite This: ACS Appl. Bio Mater*, t. 2020, s. 8413, 2020, doi: 10.1021/acsabm.0c00688.
- [167] P. Fernanda *i in.*, „Inhibition of bacterial adhesion on cellulose acetate membranes containing silver nanoparticles”, *Cellulose*, t. 22, doi: 10.1007/s10570-015-0752-6.
- [168] C. Liu i R. Bai, „Preparation of chitosan/cellulose acetate blend hollow fibers for adsorptive performance”, *J Memb Sci*, t. 267, nr 1–2, s. 68–77, grudz. 2005, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2005.06.001.
- [169] M. P. Arrieta, M. A. Peltzer, M. D. C. Garrigós, i A. Jiménez, „Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol”, *J Food Eng*, t. 114, nr 4, s. 486–494, luty 2013, doi: 10.1016/J.JFOODENG.2012.09.002.
- [170] S. Waheed *i in.*, „Synthesis, characterization, permeation and antibacterial properties of cellulose acetate/polyethylene glycol membranes modified with chitosan”, *Desalination*, t. 351, s. 59–69, paź. 2014, doi: 10.1016/J.DESAL.2014.07.019.
- [171] S. Milovanovic, D. Markovic, K. Aksentijevic, D. B. Stojanovic, J. Ivanovic, i I. Zizovic, „Application of cellulose acetate for controlled release of thymol”, *Carbohydr Polym*, t. 147, s. 344–353, sie. 2016, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2016.03.093.
- [172] S. Halder *i in.*, „Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents”, *Springerplus*, t. 4, nr 1, s. 672, 2015, doi: 10.1186/s40064-015-1476-7.
- [173] A.-N. Spiess i N. Neumeyer, „An evaluation of R2 as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach”, *BMC Pharmacol*, t. 10, nr 1, s. 6, 2010, doi: 10.1186/1471-2210-10-6.
- [174] C. S. K. Achoundong, N. Bhuwania, S. K. Burgess, O. Karvan, J. R. Johnson, i W. J. Koros, „Silane Modification of Cellulose Acetate Dense Films as Materials for Acid Gas Removal”, *Macromolecules*, t. 46, nr 14, s. 5584–5594, lip. 2013, doi: 10.1021/ma4010583.

- [175] A. Khalf, K. Singarapu, i S. V. Madihally, „Cellulose acetate core–shell structured electrospun fiber: fabrication and characterization”, *Cellulose*, t. 22, nr 2, s. 1389–1400, kwi. 2015, doi: 10.1007/s10570-015-0555-9.
- [176] A. Tenorio-Alfonso, M. C. Sánchez, i J. M. Franco, „Preparation, Characterization and Mechanical Properties of Bio-Based Polyurethane Adhesives from Isocyanate-Functionalized Cellulose Acetate and Castor Oil for Bonding Wood”, *Polymers (Basel)*, t. 9, nr 12, s. 132, kwi. 2017, doi: 10.3390/polym9040132.
- [177] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2004. doi: 10.1002/0470011149.
- [178] Y. Zhou, Y. Jiang, Y. Zhang, i L. Tan, „Improvement of Antibacterial and Antifouling Properties of a Cellulose Acetate Membrane by Surface Grafting Quaternary Ammonium Salt”, *ACS Appl Mater Interfaces*, t. 14, nr 33, s. 38358–38369, sie. 2022, doi: 10.1021/acsami.2c09963.
- [179] M. Schilling, M. Bouchard, H. Khanjian, T. Learner, A. Phenix, i R. Rivenc, „Application of Chemical and Thermal Analysis Methods for Studying Cellulose Ester Plastics”, *Acc Chem Res*, t. 43, nr 6, s. 888–896, cze. 2010, doi: 10.1021/ar1000132.
- [180] M. Kamimura, T. Kitazawa, Y. Yoshino, K. Tatsuno, i K. Koike, „Bacillus cereus as a pathogen and retention of medical devices are risk factors for Bacillus bacteremia”, *International Journal of Infectious Diseases*, t. 14, s. e391, mar. 2010, doi: 10.1016/j.ijid.2010.02.489.
- [181] Y.-H. Hsueh, E. B. Somers, D. Lereclus, i A. C. L. Wong, „Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator”, *Appl Environ Microbiol*, t. 72, nr 7, s. 5089–5092, lip. 2006, doi: 10.1128/AEM.00573-06.
- [182] R. Bland, J. Waite-Cusic, A. J. Weisberg, E. R. Riutta, J. H. Chang, i J. Kovacevic, „Adaptation to a Commercial Quaternary Ammonium Compound Sanitizer Leads to Cross-Resistance to Select Antibiotics in *Listeria monocytogenes* Isolated From Fresh Produce Environments”, *Front Microbiol*, t. 12, sty. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2021.782920.
- [183] S. Galié, C. García-Gutiérrez, E. M. Miguélez, C. J. Villar, i F. Lombó, „Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods”, *Front Microbiol*, t. 9, maj 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00898.
- [184] Y. Zheng, L. He, T. K. Asiamah, i M. Otto, „Colonization of medical devices by staphylococci”, *Environ Microbiol*, t. 20, nr 9, s. 3141–3153, wrz. 2018, doi: 10.1111/1462-2920.14129.
- [185] H. D. Isenberg, *Clinical microbiology procedures handbook*, 3. wyd. 2004.

- [186] Y. X. Xu, K. M. Kim, M. A. Hanna, i D. Nag, „Chitosan–starch composite film: preparation and characterization”, *Ind Crops Prod*, t. 21, nr 2, s. 185–192, mar. 2005, doi: 10.1016/J.INDCROP.2004.03.002.
- [187] A. Ashori i R. Bahrami, „Modification of Physico-Mechanical Properties of Chitosan-Tapioca Starch Blend Films Using Nano Graphene”, *Polym Plast Technol Eng*, t. 53, nr 3, s. 312–318, luty 2014, doi: 10.1080/03602559.2013.866246.
- [188] M. C. Silva-Pereira, J. A. Teixeira, V. A. Pereira-Júnior, i R. Stefani, „Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration”, *LWT - Food Science and Technology*, t. 61, nr 1, s. 258–262, kwi. 2015, doi: 10.1016/J.LWT.2014.11.041.
- [189] Y. Diao *i in.*, „Effect of interactions between starch and chitosan on waxy maize starch physicochemical and digestion properties”, *CyTA - Journal of Food*, t. 15, nr 3, s. 327–335, lip. 2017, doi: 10.1080/19476337.2016.1255916.
- [190] T. Calvo-Correas, M. D. Martin, A. Retegi, N. Gabilondo, M. A. Corcuera, i A. Eceiza, „Synthesis and Characterization of Polyurethanes with High Renewable Carbon Content and Tailored Properties”, *ACS Sustain Chem Eng*, t. 4, nr 10, s. 5684–5692, paź. 2016, doi: 10.1021/acssuschemeng.6b01578.

## 6 Spis rysunków i zdjęć

Rysunek 1. 1 Ilustracja blokowania membrany dla a) Całkowitego blokowania, b) Standardowego blokowania, c) Pośredniego blokowania, d) Filtracji plackowej; Kolorem czerwonym przedstawiono bakterie zdeponowane na powierzchni membrany.....	8
Rysunek 1. 2 Wzory strukturalne: a) octanu celulozy; b) poliamidów; R oznacza resztę związku użytego do syntezy; c) chitozanu; d) skrobi.....	9
Rysunek 1. 3 Wykres fazowy ditlenku węgla .....	13
Rysunek 1. 4 Zanik menisku między fazą ciekłą i gazową ditlenku węgla przy wzroście ciśnienia i temperatury w pobliżu punktu krytycznego; [na podstawie [57][58]] .....	13
Rysunek 1. 5 Schemat procesu impregnacji nadkrytycznej (SSI).....	16
Rysunek 1. 6 Schemat procesu impregnacji wspomaganą płynem nadkrytycznym (SAI).....	18
Rysunek 1. 7 Przyłączanie grup funkcyjnych substancji aktywnej (czerwone końcówki) do grup funkcyjnych modyfikowanego materiału (bordowe wypustki); przed reakcją (a) i po reakcji (b) .....	20



Rysunek 2. 1 Schemat aparatury wysokociśnieniowej składający się z: A – butli CO <sub>2</sub> , B – kompresora powietrza, C – kompresora wysokociśnieniowego, D – naczynia wysokociśnieniowego. ....	28
Rysunek 2. 2 Położenie membran oraz naczynia z karwakrolem w procesie impregnacji nadkrytycznej. 30	
Rysunek 2. 3 Zestaw do filtracji krzyżowej. ....	32
Rysunek 2. 4 Zestaw do pomiaru uwalniania karwakrolu z membran poliamidowych do ditlenku węgla: A – butla CO <sub>2</sub> , B – naczynie wysokociśnieniowe o pojemności 280 mL, C – filtracyjny moduł stalowy z membraną, D – rotametr. ....	34
Rysunek 2. 5 Zestaw do badania wpływu wdmuchiwania ditlenku węgla na zakażenie bakteriami modelu otwartej klatki piersiowej. Zestaw składa się z: A - butla CO <sub>2</sub> , B - naczynie wysokociśnieniowe, C - stalowy moduł filtracyjny, D - model otwartej klatki piersiowej. ....	35
Rysunek 2. 6 Reakcja syntezy QAC 1. ....	40
Rysunek 2. 7 Reakcja syntezy QAC 2. ....	41
Rysunek 2. 8 Reakcja syntezy QAC 3. ....	42
Rysunek 2. 9 Umieszczenie reagentów i polimerów zabezpieczonych filtrem papierowym w reaktorze wysokociśnieniowym o pojemności 25 mL. ....	44
Rysunek 2. 10 Schemat dwustopniowej nadkrytycznej reakcji szczepienia materiału z grupami hydroksylowymi. ....	45
Rysunek 3. 1 Kinetyka impregnacji membran poliamidowych karwakrolem przy 40°C wraz z odchyleniem standardowym. ....	51
Rysunek 3. 2 Kinetyka impregnacji membran z octanu celulozy karwakrolem przy 40°C wraz z odchyleniem standardowym. ....	51
Rysunek 3. 3 Wzory strukturalne poliamidu z wiązaniami wodorowymi pomiędzy łańcuchami polimeru pokazano na czerwono (a) i karwakrolu (b); możliwe wiązania wodorowe w poliamidzie zaimpregnowanym karwakrolem (c).[141] ....	54
Rysunek 3. 4 Wzory strukturalne octanu celulozy (a) i karwakrolu (b); możliwe wiązania wodorowe w octanie celulozy zaimpregnowanym karwakrolem (c). ....	55
Rysunek 3. 5 Widma FTIR karwakrolu (a) oraz niezaimpregnowanej i zaimpregnowanej membrany poliamidowej (b) ....	56

Rysunek 3. 6 Zdjęcia SEM powierzchni niezaimpregnowanej membrany poliamidowej (PA) i membrany poliamidowej z 30% wag. karwakrołu (PA 30% karw.). Podziałka = 3 $\mu\text{m}$ na mikrografiach (a,b); Podziałka = 500 nm na mikrografiach (c,d).....	59
Rysunek 3. 7 Zdjęcia SEM przekrojów niezmodyfikowanej membrany poliamidowej (PA) i membrany poliamidowej z 30% mas. karwakrołu (PA 30% karw.). Na mikrografiach (a-d) wartości podziałki wynoszą odpowiednio 5 $\mu\text{m}$ , 4 $\mu\text{m}$ , 400 nm i 500 nm. ....	60
Rysunek 3. 8 Strumień permeatu przez niezmodyfikowaną membranę poliamidową (PA) i membrany z 20% (PA20%k) i 30% (PA30%k) karwakrołu. ....	61
Rysunek 3. 9 Zawartość karwakrołu w membranie w funkcji czasu (natężenie przepływu CO <sub>2</sub> : 5 L/min, początkowa zawartość karwakrołu: 37%).....	62
Rysunek 3. 10 Stężenie karwakrołu w ditlenku węgla w funkcji czasu (natężenie przepływu CO <sub>2</sub> : 5 l/min, początkowa zawartość karwakrołu: 37%). ....	63
Rysunek 3. 11 Uwalnianie karwakrołu poprzez dyfuzję naturalną "na powietrzu" w średniej temperaturze 25°C.....	63
Rysunek 3. 12 Poziomy skażenia wykryte bez wdmuchiwania CO <sub>2</sub> (czerwony), z wdmuchiwaniami przy użyciu niezmodyfikowanej membrany poliamidowej (niebieski) i wdmuchiwaniami przy użyciu membrany wypełnionej karwakrolem (zielony).....	64
Rysunek 3. 13 Widma podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) niezmodyfikowanej i impregnowanej membrany z 20% karwakrolem .....	65
Rysunek 3. 14 Zdjęcia SEM/FIB przekrojów membran z octanu celulozy – (a) i (b) niezaimpregnowana membrana; (c) i (d) membrana z 15% zawartością karwakrołu; (e) i (f) membrana z 30% zawartością karwakrołu.....	68
Rysunek 3. 15 Średnia średnica porów w funkcji zawartości karwakrołu (średnia wartość z 2 do 4 pomiarów). ....	69
Rysunek 3. 16 Strumień permeatu przez membranę z octanu celulozy w funkcji ciśnienia transmembranowego .....	69
Rysunek 3. 17 Przenikanie hydrodynamiczne ( $L_p$ ) w funkcji zawartości karwakrołu.....	70
Rysunek 3. 18 Średnia wartość potencjału Zeta z pięciu pomiarów w funkcji zawartości karwakrołu.....	71
Rysunek 3. 19 Liczba bakterii osadzonych na membranie na cm <sup>2</sup> jej powierzchni i mL permeatu; membrany z ładunkiem karwakrołu 0–25%.....	72

Rysunek 3. 20 Logarytm liczby bakterii osadzonych na membranie na $\text{cm}^2$ jej powierzchni i mL permeatu; membrany z ładunkiem karwakrolu 0-25%. Procent nad żółtymi kolumnami pokazuje udział bakterii martwych w ogólnej liczbie bakterii. ....	73
Rysunek 3. 21 Spadek strumienia permeatu w systemie filtracji krzyżowej zawiesiny <i>S. aureus</i> . ....	74
Rysunek 3. 22 Strumień permeatu wody przez membranę z octanu celulozy (0% karwakrolu) przed i po 30 minutach filtracji krzyżowej (TMP 55 kPa) w funkcji ciśnienia transmembranowego (TMP) .....	75
Rysunek 3. 23 $R^2$ dla wszystkich modeli blokujących i czterech typów membran.....	76
Rysunek 3. 24 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu <i>S. aureus</i> do modelu blokowania pośredniego; SSR wyraża się w [ $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2$ ]; (● – wartości doświadczalne).....	78
Rysunek 3. 25 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu <i>S. aureus</i> do modelu całkowitego blokowania; SSR wyraża się w [ $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2$ ]; (●– wartości doświadczalne).....	78
Rysunek 3. 26 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu <i>S. aureus</i> do modelu standardowego blokowania; SSR wyraża się w [ $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2$ ]; (●– wartości doświadczalne).....	79
Rysunek 3. 27 Dopasowanie wyników eksperymentalnych filtracji krzyżowej bulionu <i>S. aureus</i> do modelu filtracji plackowej; SSR wyraża się w [ $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}^2$ ]; (●– wartości doświadczalne).....	79
Rysunek 3. 28 Współczynnik powierzchniowy $K_{IPB}$ uzyskany poprzez modelowanie pośredniego mechanizmu blokującego dla różnych ładunków karwakrolu w membranach. ....	80
Rysunek 3. 29 Materiał (octan celulozy lub blend skrobiowo-chitozanowy) z zaszczepionym linkerem do grupy hydroksylowej materiału .....	83
Rysunek 3. 30 Wzory strukturalne uzyskanych materiałów po przyłączeniu do linkera HDI: a) QAC 1, b) QAC 2, c) QAC 3 .....	83
Rysunek 3. 31 Kąt zwilżania w funkcji czasu dla niezmodyfikowanej membrany z octanu celulozy (CA), membran CA szczepionych linkerem (CA-HDI) i membran po szczepieniu czwartorzędowymi związkami amoniowymi (QAC) (CA-QAC 1 i CA-QAC 2).....	85
Rysunek 3. 32 Widma FTIR niezmodyfikowanych (CA) i szczepionych linkerem (CA-HDI) kulek octanu celulozy.....	86
Rysunek 3. 33 Widma FTIR octanu celulozy z porównaniem próbek zaszczepionych HDI i QAC 1 (a) oraz HDI i QAC 2 (b).....	87
Rysunek 3. 34 Zdjęcia SEM-FIB niezmodyfikowanych kulek z octanu celulozy (CA): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d).....	89
Rysunek 3. 35 Zdjęcia SEM-FIB kulek z octanu celulozy szczepionych linkerem (CA-HDI): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d). ....	89

Rysunek 3. 36 Zdjęcia SEM-FIB kulki z octanu celulozy szczepionej QAC 1 (CA-QAC 1): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d).	90
Rysunek 3. 37 Zdjęcia SEM-FIB kulki z octanu celulozy szczepionych QAC 2 (CA-HDI-QAC 2): powierzchnia (a), (b) i (c); przekrój (d).	91
Rysunek 3. 38 Wyniki analizy DSC niezmodyfikowanych (CA) i szczepionych (CA-HDI, CA-HDI-QAC 1 i CA-HDI-QAC 2) kulek z octanu celulozy	92
Rysunek 3. 39 Redukcja całkowitej liczby bakterii przyłączonych do CA-QAC 1 i CA-QAC 2 (obliczona dla 99,9% redukcji dla CA-QAC 2) w porównaniu z CA, wyrażona jako log CFU,	94
Rysunek 3. 40 Powierzchnie polimerowe po ekspozycji na szczep MRSA ATCC 43300. Niezmodyfikowany CA (a), CA- QAC 1 (b) i CA- QAC 2 (c),	95
Rysunek 3. 41 Redukcja całkowitej liczby bakterii w logCFU po 24 godzinnej inkubacji w bulionie sojowym Tryptone z CA, CA-QAC 1 i CA-QAC 2, Ujemna wartość logCFU wskazuje na zwiększony wzrost liczby bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej (bez materiału),	98
Rysunek 3. 42 Kąt zwilżania w funkcji czasu dla niezmodyfikowanej membrany z blendów skrobiowo-chitozanowych (SC), membran SC szczepionych linkerem (SC-HDI) i membran po szczepieniu czwartorzędowymi związkami amoniowymi (QAC) (SC-QAC 2 i SC-QAC 3).	100
Rysunek 3. 43 Widma FTIR niezmodyfikowanych (SC) i szczepionych linkerem (SC-HDI) blendów skrobiowo-chitozanowych.	100
Rysunek 3. 44 Wzór strukturalny blendu skrobiowo-chitozanowego. Potencjalne interakcje między skrobią a chitozanem zaznaczono przerywaną, czerwoną linią.	101
Rysunek 3. 45 Widma FTIR blendów skrobiowo-chitozanowych (SC) z porównaniem próbek zaszczipionych HDI i QAC 2 (a) oraz HDI i QAC 3 (b).	102
Rysunek 3. 46 Widma FTIR blendu skrobiowo-chitozanowego zaszczipionego linkerem (SC-HDI) z porównaniem do próbki zaszczipionej QAC2 przez 2 godziny (SC-QAC2-2h). Widoczny pik przy $2269\text{ cm}^{-1}$ świadczy o nieprzereagowanej grupie izocyjanianowej.	103
Zdjęcie 2. 1 Naczynie wysokociśnieniowe HPE-500 o pojemności 280 mL (a); Naczynie wysokociśnieniowe model HPVC 350 o pojemności 25 mL (b)	29
Zdjęcie 2. 2 Zestaw eksperymentalny wdmuchiwania ditlenku węgla do modelu klatki piersiowej z wykorzystaniem modułu filtracyjnego z membraną zaimpregnowaną karwakrolem. Na zdjęciu widoczne są dwie płytki z pożywką agarową.	36
Zdjęcie 2. 3 Użyty zestaw do syntezy czwartorzędowych związków amoniowych	39

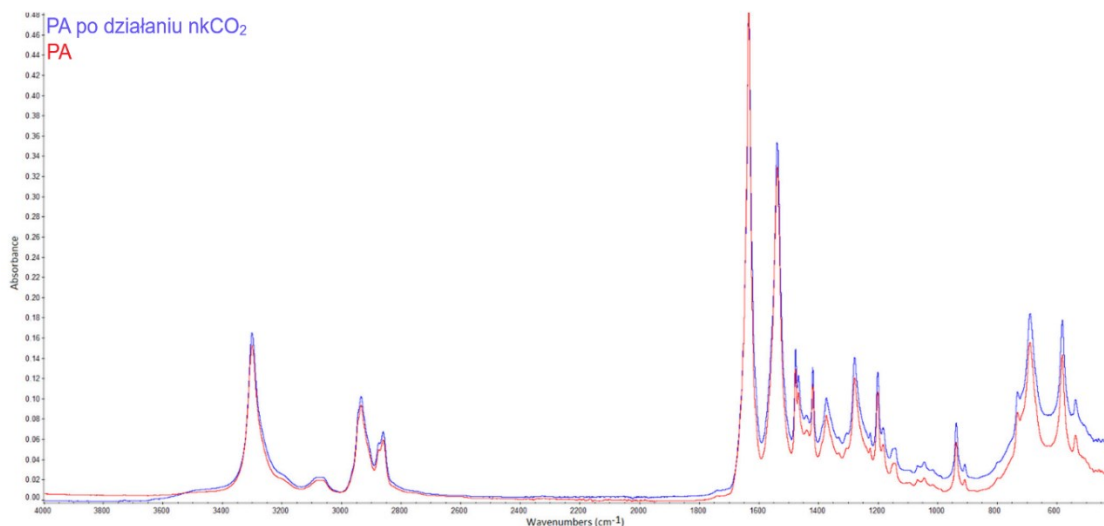
## 7 Spis tabel

Tabela 1. 1 Rodzaje blokowania membrany wraz z wartościami parametru n. ....	8
Tabela 1. 2 Aplikacja chitozanu w zależności od stopnia deacetylacji oraz masy cząsteczkowej chitozanu.[48].....	11
Tabela 1. 3 Temperatura i ciśnienie krytyczne wybranych rozpuszczalników .....	15
Tabela 2. 1 Lista materiałów użytych w badaniach rozprawy doktorskiej.....	27
Tabela 2. 2 Rozwiązania równania 3 dla filtracji krzyżowej pod stałym ciśnieniem.....	33
Tabela 2. 3 Zsyntezowane do pracy eksperymentalnej czwartorzędowe związki amoniowe wraz z stosowanym w pracy skrótem oraz wzorem strukturalnym .....	38
Tabela 3. 1 Wykaz charakterystycznych pików w widmach FTIR: karwakrołu, poliamidu, zaimpregnowanego karwakrolem poliamidu wraz z ich długościami falowymi .....	56
Tabela 3. 2 Wykaz charakterystycznych pików w widmach FTIR: karwakrołu, octanu celulozy, zaimpregnowanego karwakrolem octanu celulozy wraz z ich długościami falowymi.....	66
Tabela 3. 3 Wyniki analizy DSC niezmodyfikowanych i szczepionych kulek polimerowych. ....	92
Tabela 3. 4 Odporność na odkształcenia kulek niezmodyfikowanych (CA), zaszczepionych linkerem (CA-HDI), zaszczepionych QAC (CA-QAC 1 oraz CA-QAC 2) .....	93
Tabela 3. 5 Przyłączenie drobnoustrojów do CA, CA-HDI-QAC 1 i CA-HDI-QAC 2 wyrażone jako całkowita liczba jednostek tworzących kolonie na mm <sup>2</sup> (CFU/mm <sup>2</sup> ). ....	93
Tabela 3. 6 Całkowita liczba bakterii (CFU/mL) po 24 h inkubacji w bulionie sojowym Trypton z próbkami: CA, CA-HDI-QAC 1 i CA-HDI-QAC 2. ....	97

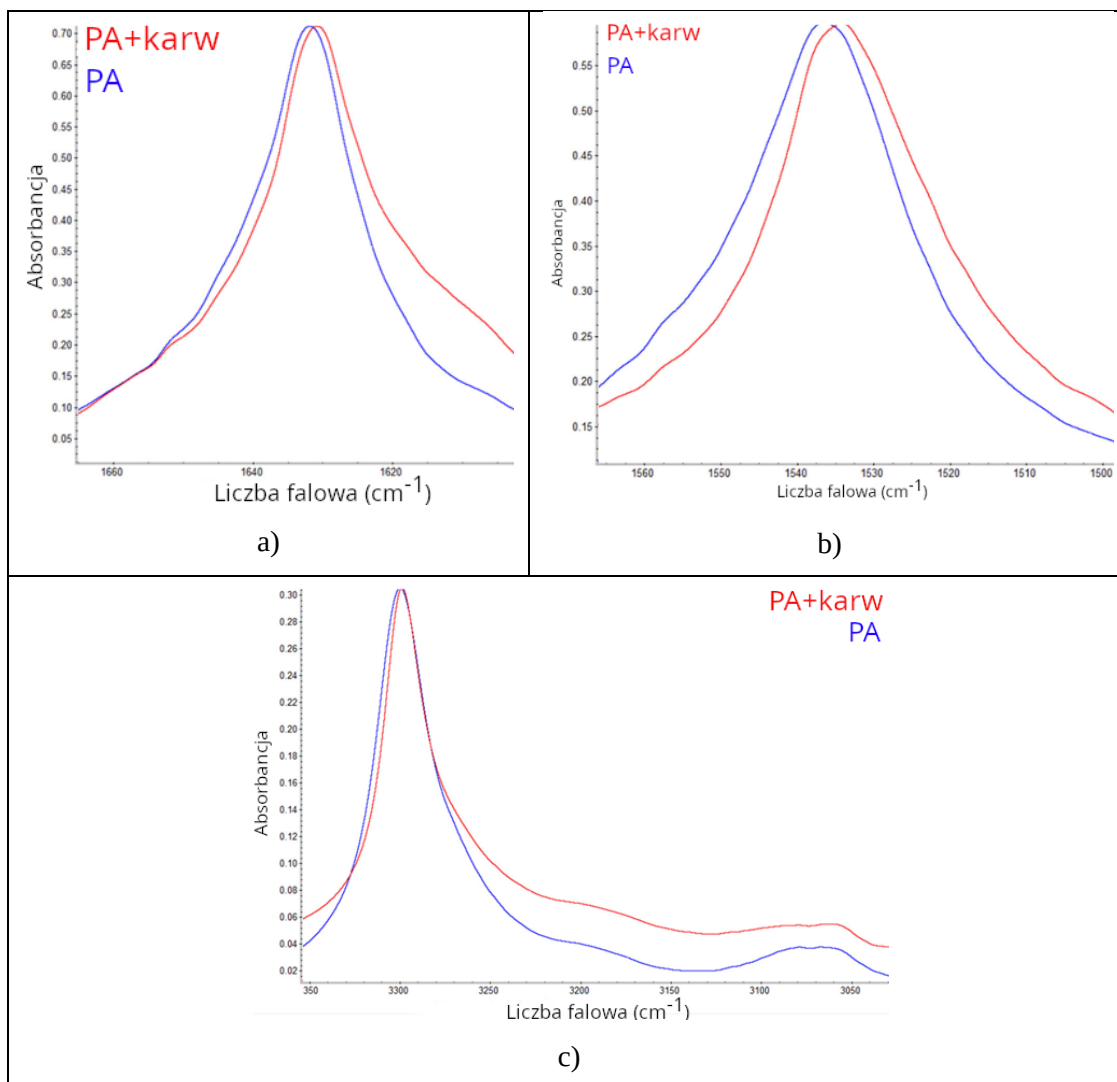
## 8 Załącznik

Rysunek Z. 1 Widma FTIR membrany niezmodyfikowanej oraz niezmodyfikowanej, poddanej działaniu scCO <sub>2</sub> przy 20 MPa i 40 °C przez 3 godziny.....	130
Rysunek Z. 2 Przesunięcie pasm w próbce po impregnacji: a) drgań rozciągających C=O (pik przy 1631 cm <sup>-1</sup> ) i (pik przy 1630 cm <sup>-1</sup> ); b) drgań nożycowych N-H (pik przy 1536 cm <sup>-1</sup> ) (pik przy 1534 cm <sup>-1</sup> ); c) drgań rozciągających N-H (piki 3299 i 3076 cm <sup>-1</sup> )(3298 i 3065 cm <sup>-1</sup> ). ....	130

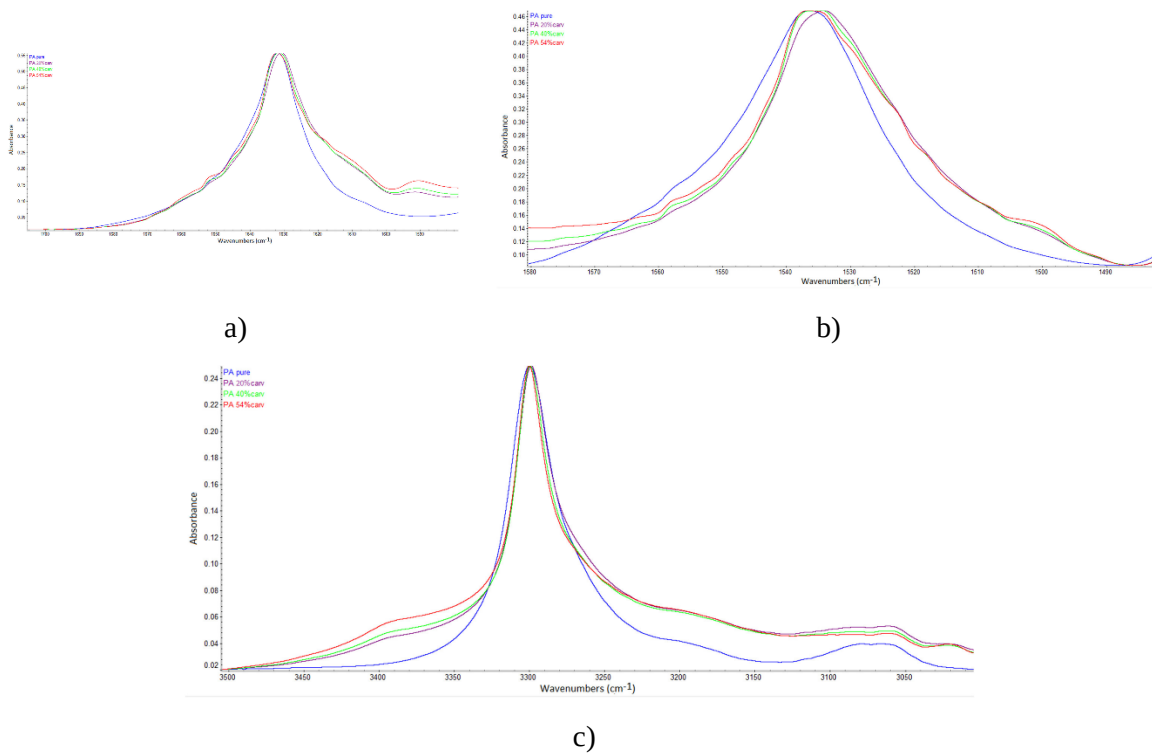
Rysunek Z. 3 Przesunięcie pasm w membranach poliamidowych przed i po impregnacji wyższym ładunkiem: a) drgania rozciągające C=O; b) Pasma drgań nożycowych N–H; c) Pasma drgań rozciągających N–H .....	131
Rysunek Z. 4 $R^2$ dla modeli całkowitego, standardowego i pośredniego i czterech typów membran. 131	131
Rysunek Z. 5 Współczynnik powierzchniowy $K_{IPB}$ uzyskany poprzez modelowanie w programie MatlabR2023a pośredniego mechanizmu blokującego dla różnych ładunków karwakrolu w membranach .....	132
Rysunek Z. 6 Widmo $^{13}C$ NMR QAC1 .....	132
Rysunek Z. 7 Widmo $^1H$ NMR QAC 1 .....	133
Rysunek Z. 8 Widmo FTIR QAC 1 .....	133
Rysunek Z. 9 Widmo $^{13}C$ NMR QAC 2 .....	134
Rysunek Z. 10 Widmo $^1H$ NMR QAC 2 .....	135
Rysunek Z. 11 Widmo FTIR QAC 2 .....	135
Rysunek Z. 12 Widmo $^{13}C$ NMR QAC 3 .....	136
Rysunek Z. 13 Widmo $^1H$ NMR QAC 3 .....	136
Rysunek Z. 14 Widmo FTIR QAC 3 .....	137
Rysunek Z. 15 Widma FTIR powierzchni i przekroju octanu celulozy zaszczipionej: a) QAC 1; b) QAC 2 .....	139
Tabela Z 1 Zdjęcia kropeł wody na powierzchni zmodyfikowanego i niezmodyfikowanego octanu celulozy w badaniu zwilżalności wraz ze wskazaniem wartości lewego i prawego kąta zwilżania kropli. ....	138
Tabela Z 2 Zdjęcia kropeł wody na powierzchni zmodyfikowanego i niezmodyfikowanego blendu skrobiowo-chitozanowego w badaniu zwilżalności wraz ze wskazaniem wartości lewego i prawego kąta zwilżania kropli. ....	140



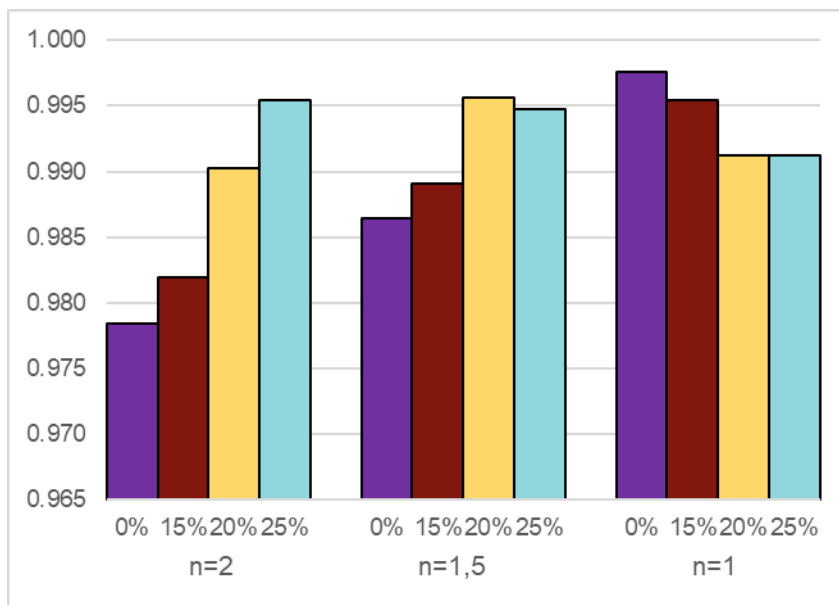
Rysunek Z. 1 Widma FTIR membrany niezmodyfikowanej oraz niezmodyfikowanej, poddanej działaniu scCO<sub>2</sub> przy 20 MPa i 40 °C przez 3 godziny.



Rysunek Z. 2 Przesunięcie pasm w próbce po impregnacji: a) drgań rozciągających C=O (pik przy 1631  $\text{cm}^{-1}$ ) i (pik przy 1630  $\text{cm}^{-1}$ ); b) drgań nożycowych N-H (pik przy 1536  $\text{cm}^{-1}$ ) (pik przy 1534  $\text{cm}^{-1}$ ); c) drgań rozciągających N-H (piki 3299 i 3076  $\text{cm}^{-1}$ )(3298 i 3065  $\text{cm}^{-1}$ ).

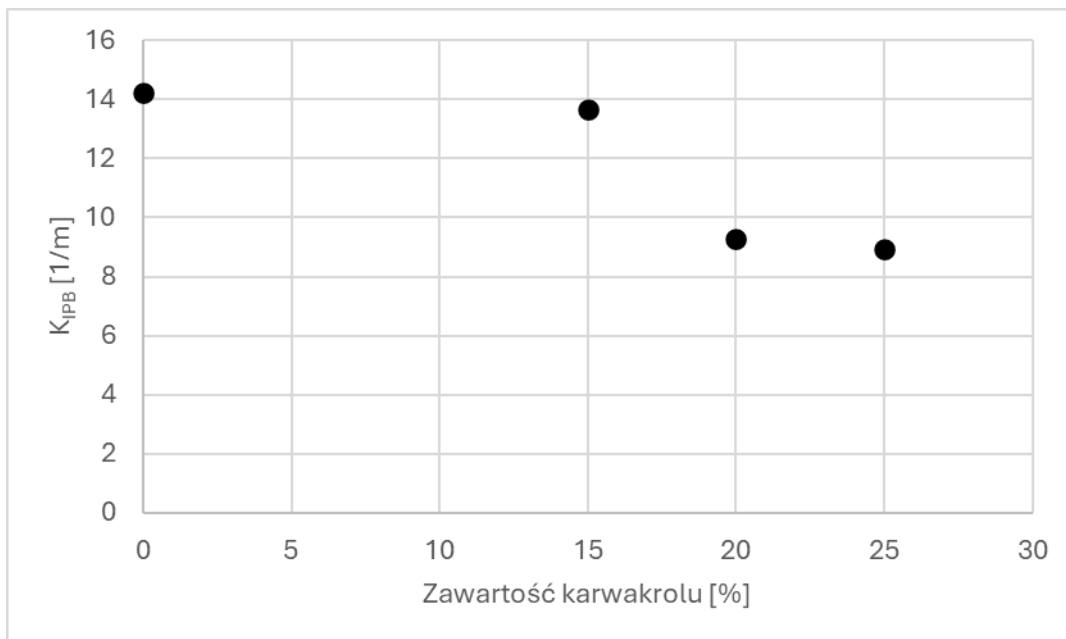


Rysunek Z. 3 Przesunięcie pasm w membranach poliamidowych przed i po impregnacji wyższym załadunkiem: a) drgania rozciągające C=O; b) Pasmo drgań nożycowych N-H; c) Pasma drgań rozciągających N-H

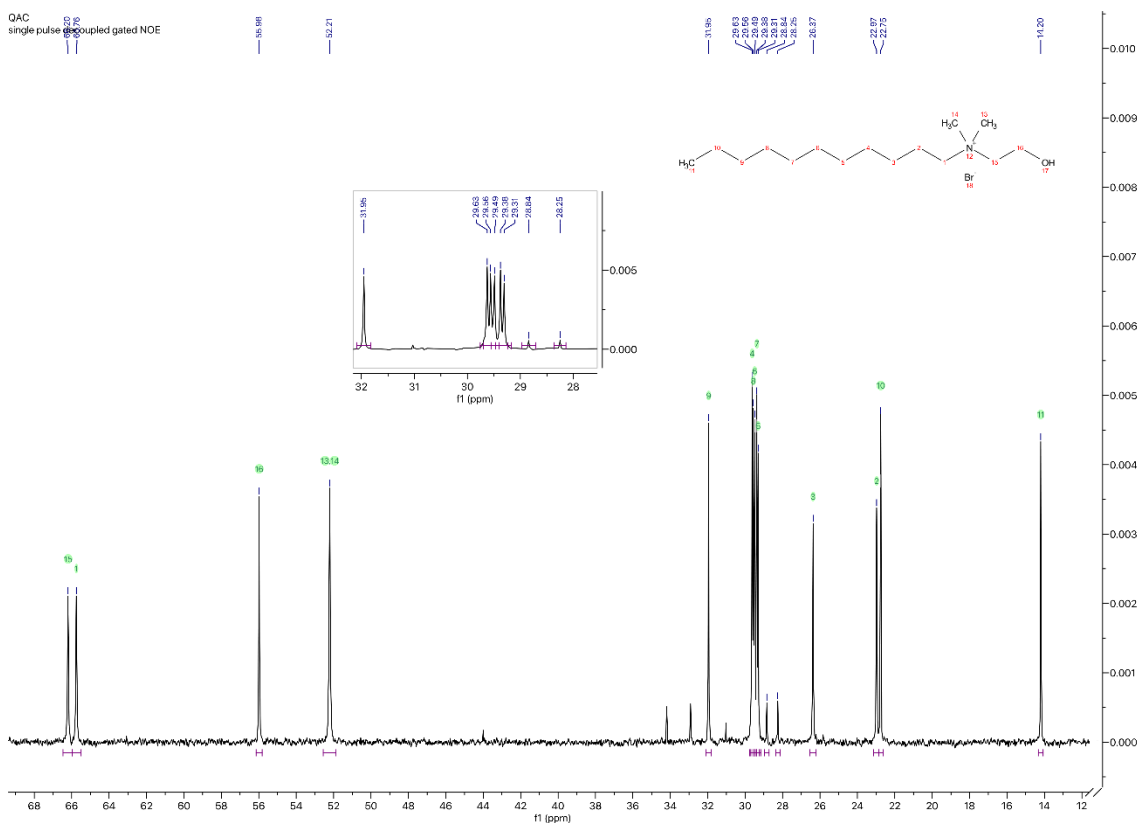


Rysunek Z. 4  $R^2$  dla modeli całkowitego, standardowego i pośredniego i czterech typów membran.

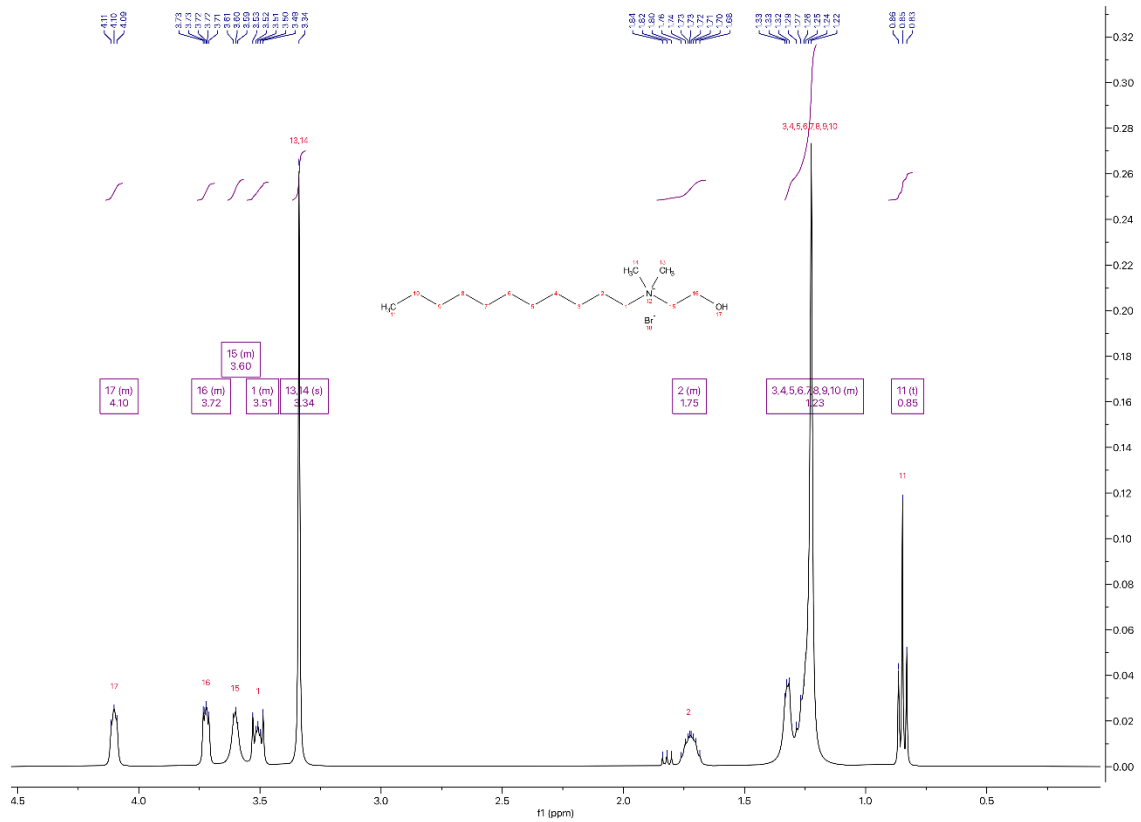




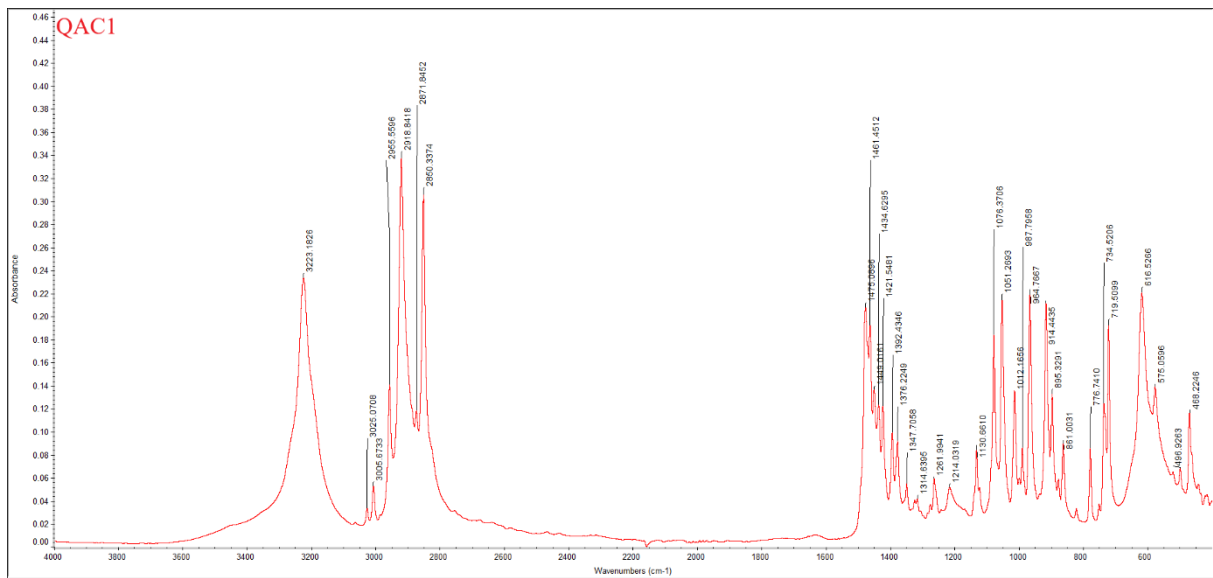
Rysunek Z. 5 Współczynnik powierzchniowy  $K_{IPB}$  uzyskany poprzez modelowanie w programie MatlabR2023a pośredniego mechanizmu blokującego dla różnych ładunków karwakuolu w membranach



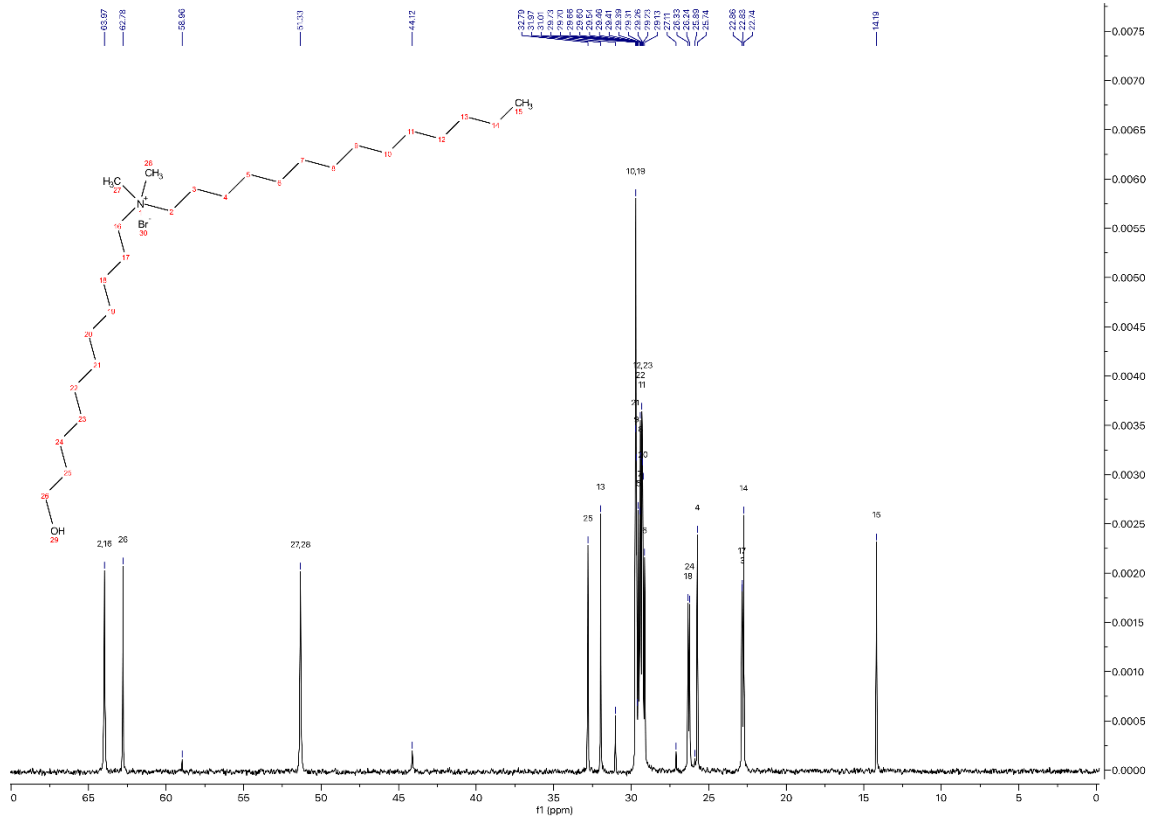
Rysunek Z. 6 Widmo  $^{13}C$  NMR QAC1



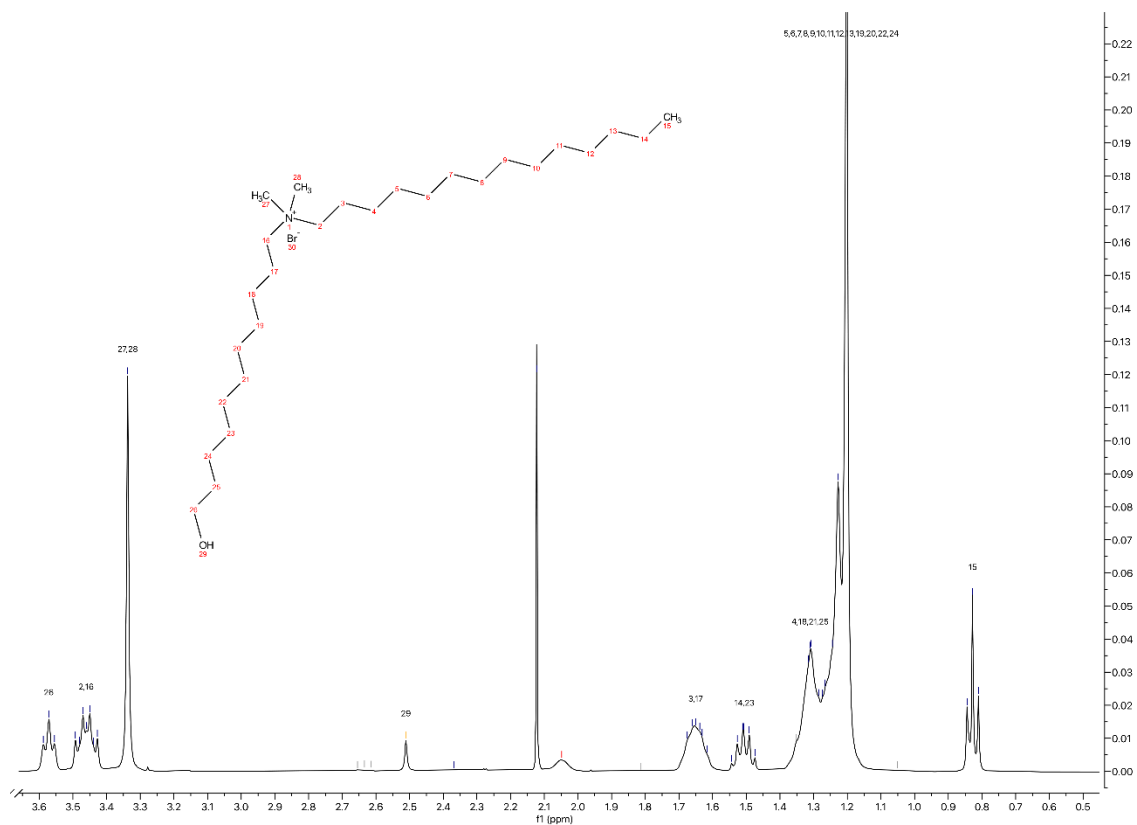
Rysunek Z. 7 Widmo 1H NMR QAC 1



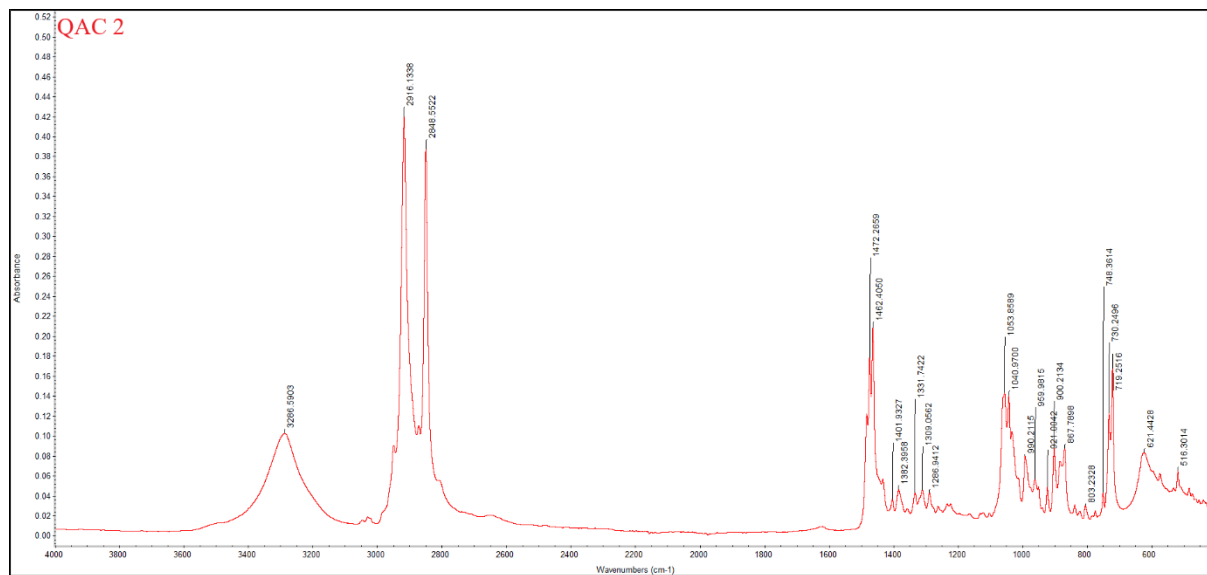
Rysunek Z. 8 Widmo FTIR QAC 1



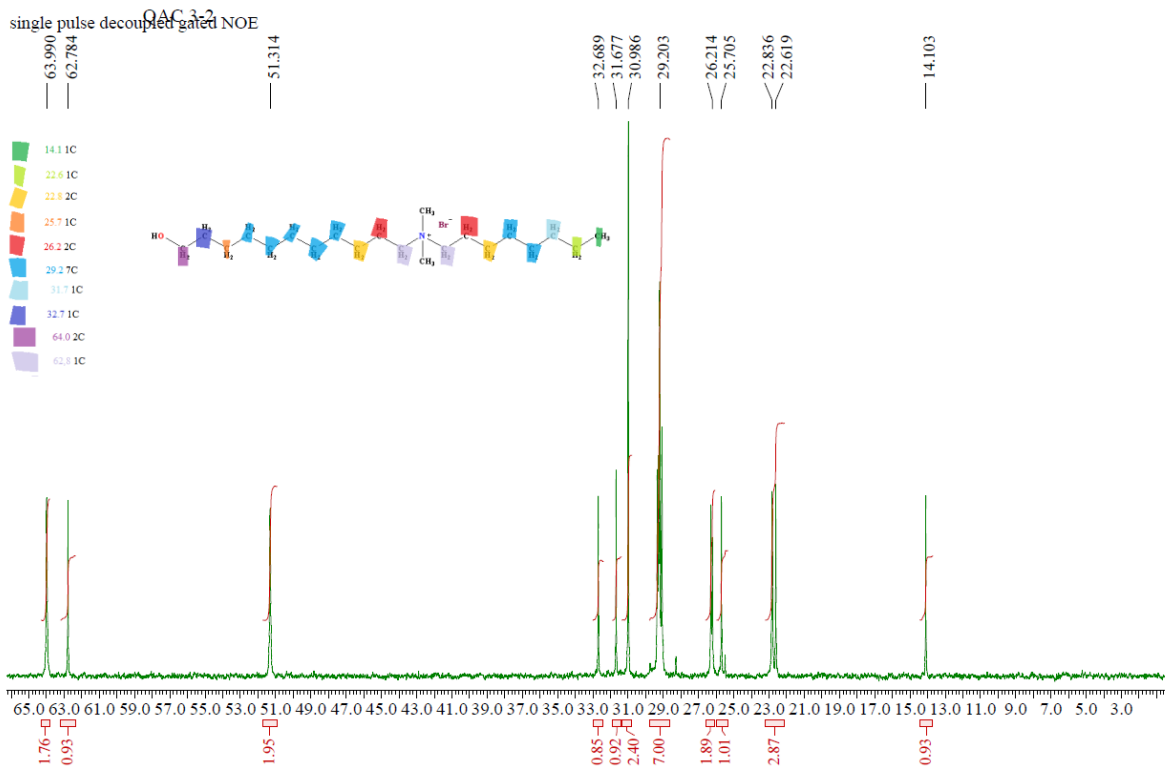
Rysunek Z. 9 Widmo <sup>13</sup>C NMR QAC 2



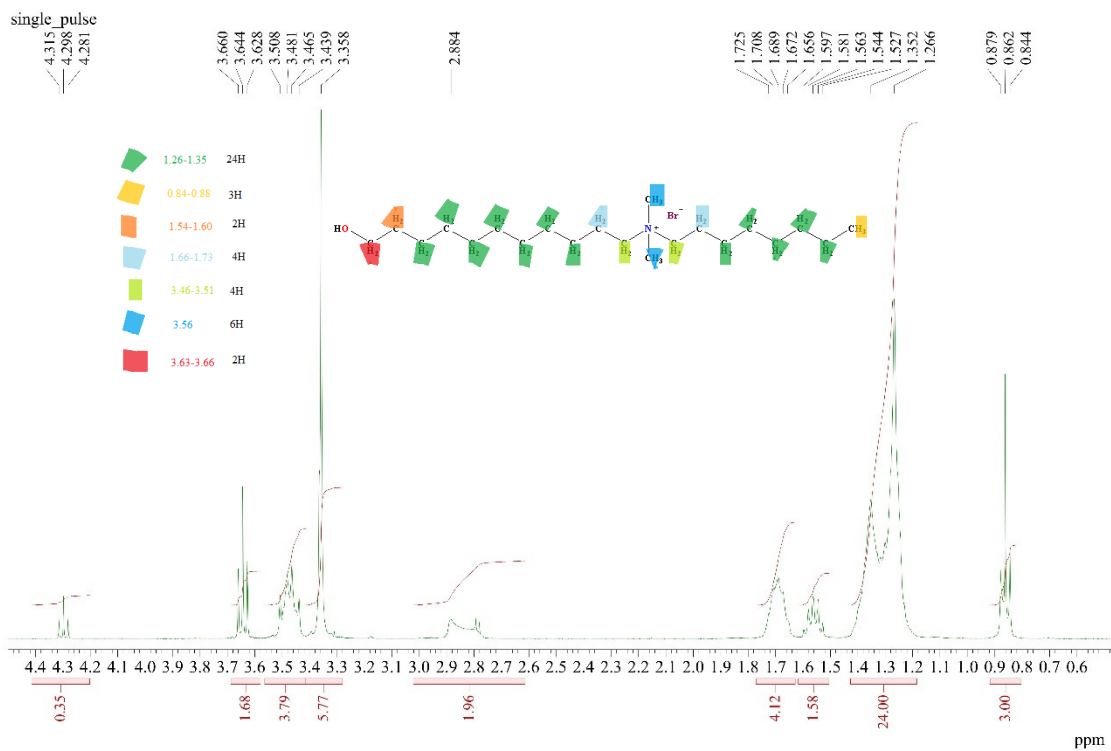
Rysunek Z. 10 Widmo  $^1\text{H}$  NMR QAC 2



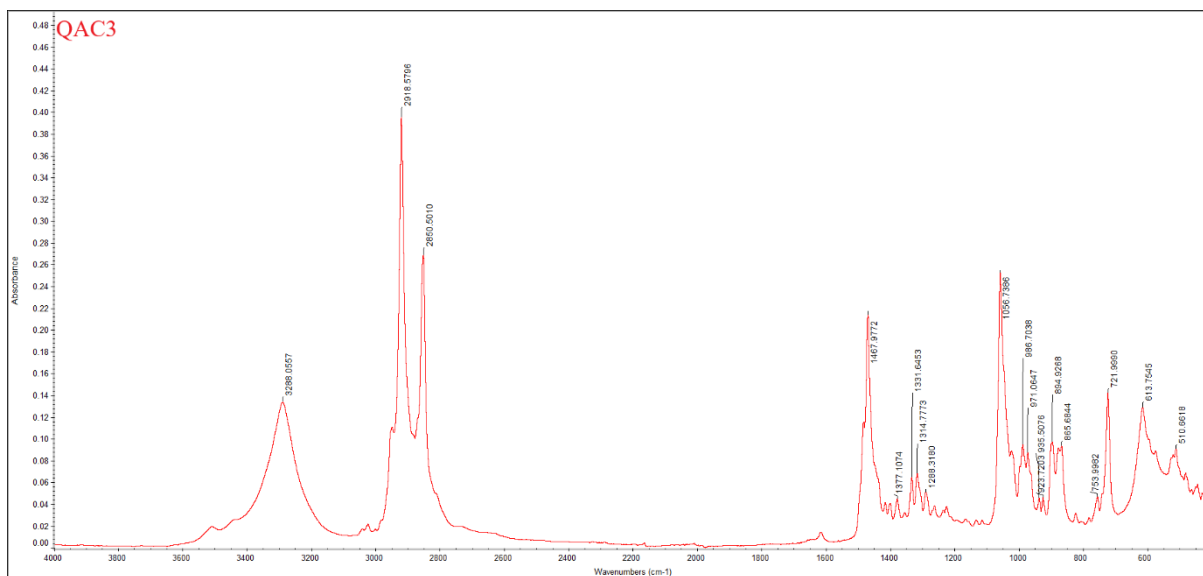
Rysunek Z. 11 Widmo FTIR QAC 2



Rysunek Z. 12 Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR QAC 3

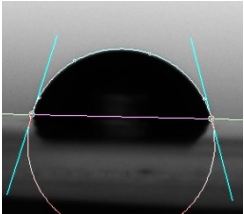
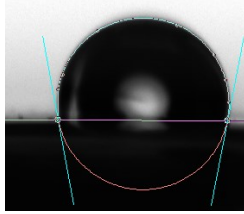
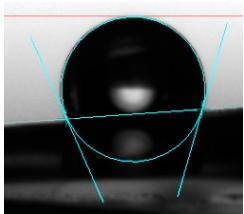
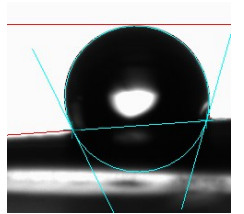
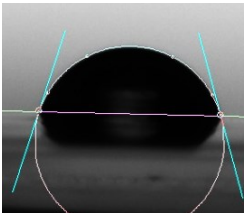
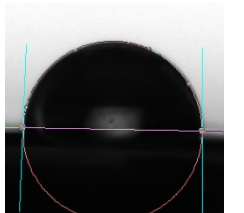
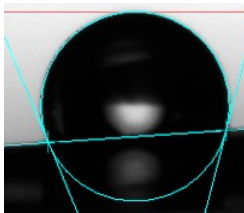
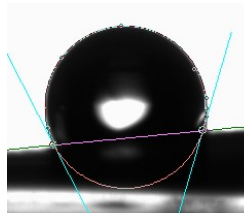
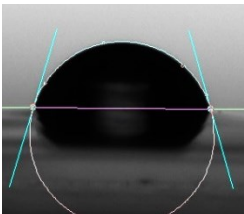
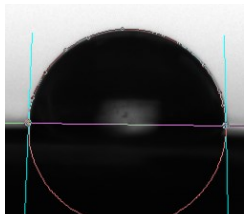
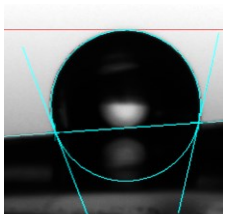
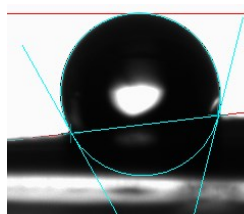
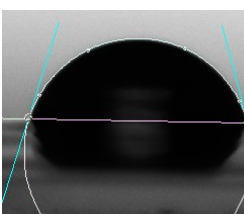
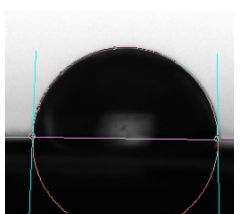
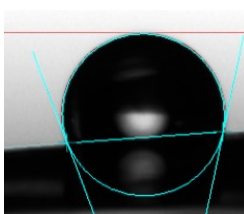
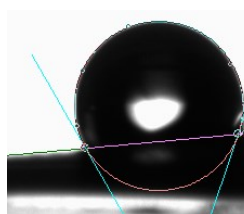
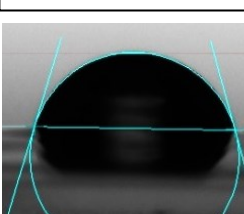
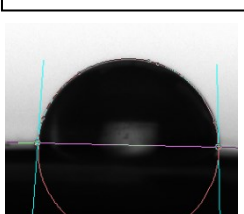
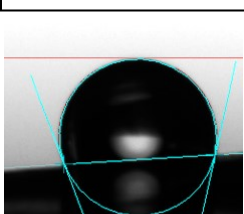
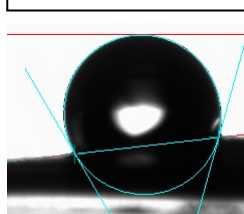


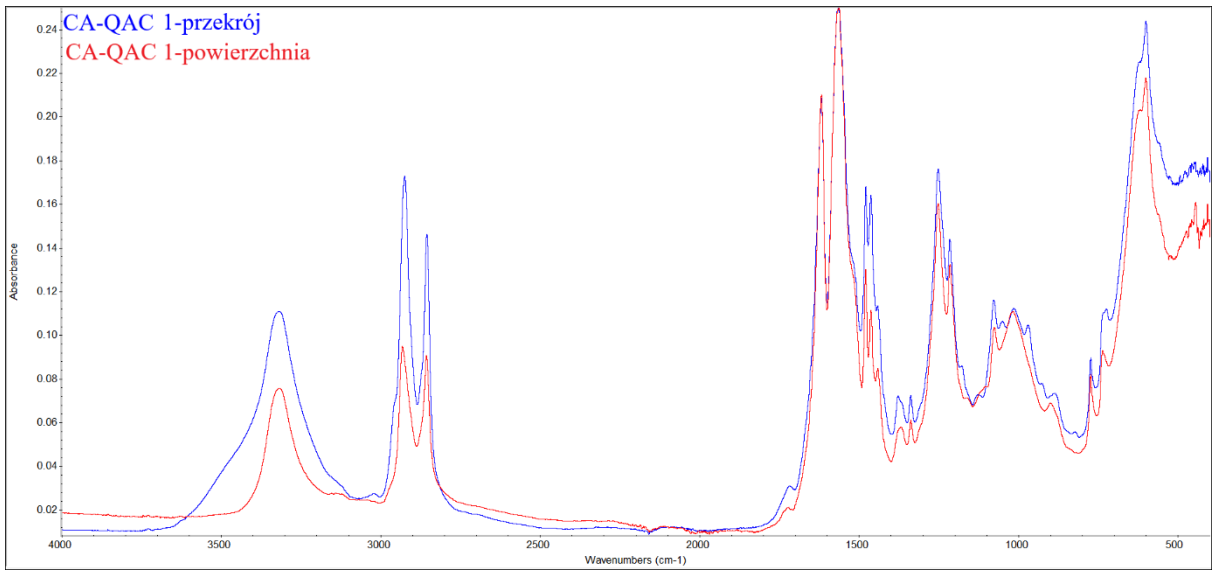
Rysunek Z. 13 Widmo  $^1\text{H}$  NMR QAC 3



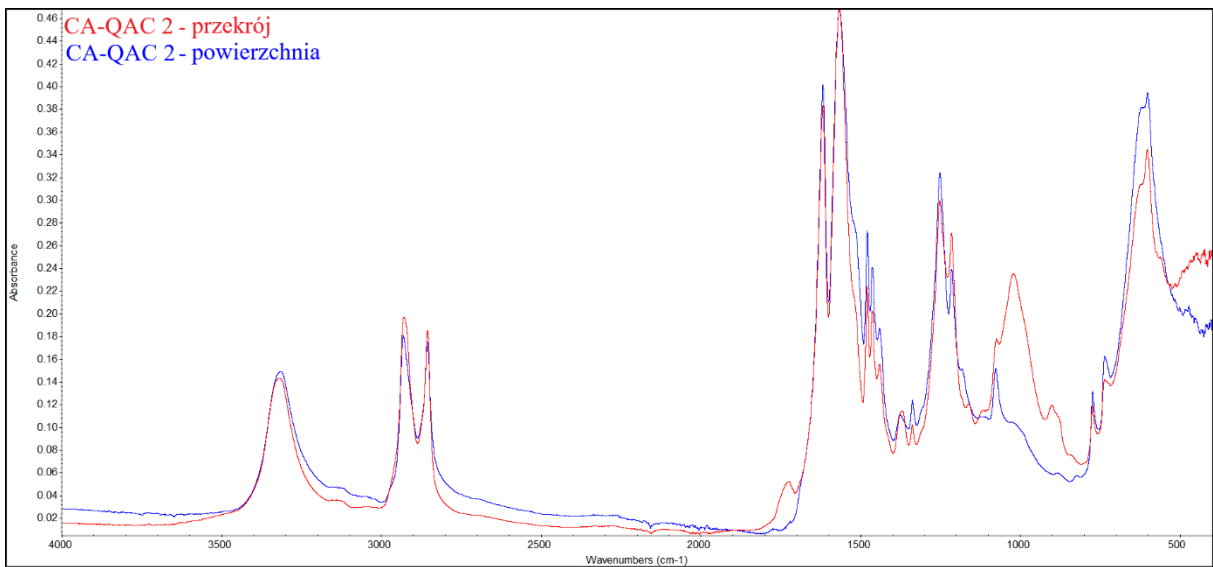
Rysunek Z. 14 Widmo FTIR QAC 3

Tabela Z 1 Zdjęcia kroplel wody na powierzchni zmodyfikowanego i niemodyfikowanego octanu celulozy w badaniu zwilżalności wraz ze wskazaniem wartości lewego i prawego kąta zwilżania kropli.

Czas [s]	CA	CA-HDI	CA-QAC 1	CA-QAC 2
0	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 73,7°                      prawy: 73,7°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 100,8°                      prawy: 100,8°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 110,0°                      prawy: 110,1°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 112,0°                      prawy: 110,0°                 </div> 
3	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 73,0°                      prawy: 73,0°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 88,5°                      prawy: 88,5°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 108,8°                      prawy: 108,4°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 111,9°                      prawy: 111,9°                 </div> 
6	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 73,4°                      prawy: 73,4°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 88,0°                      prawy: 88,0°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 107,3°                      prawy: 106,7°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 112,6°                      prawy: 110,7°                 </div> 
9	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 73,5°                      prawy: 73,5°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 88,4°                      prawy: 88,4°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 106,8°                      prawy: 106,1°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 114,4°                      prawy: 114,4°                 </div> 
12	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 74,2°                      prawy: 73,5°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 87,2°                      prawy: 87,2°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 107,0°                      prawy: 106,2°                 </div> 	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">                     lewy: 113,7°                      prawy: 111,8°                 </div> 



a)



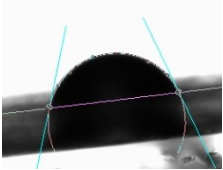
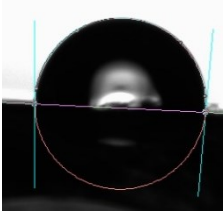
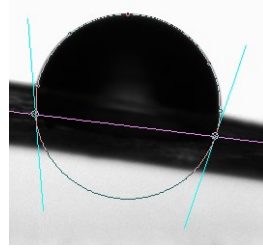
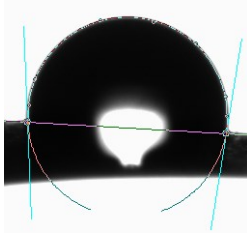
b)

Rysunek Z. 15 Widma FTIR powierzchni i przekroju octanu celulozy zaszczonej: a) QAC 1; b) QAC 2



Tabela Z 2 Zdjęcia kroplel wody na powierzchni zmodyfikowanego i niezmodyfikowanego blendu skrobiowo-chitozanowego w badaniu zwilżalności wraz ze wskazaniem wartości lewego i prawego kąta zwilżania kropli.

Czas [s]	SC	SC-HDI	SC-QAC 2	SC-QAC 3
0	lewy: 73,0° prawy: 73,0° 	lewy: 96,7° prawy: 96,7° 	lewy: 108,2° prawy: 108,2° 	lewy: 100,3° prawy: 100,3° 
3	lewy: 69,9° prawy: 69,9° 	lewy: 93,4° prawy: 93,4° 	lewy: 103,3° prawy: 103,3° 	lewy: 96,3° prawy: 96,3° 
6	lewy: 69,7° prawy: 69,7° 	lewy: 92,1° prawy: 92,1° 	lewy: 102,8° prawy: 102,8° 	lewy: 96,1° prawy: 96,1° 
9	lewy: 69,2° prawy: 69,2° 	lewy: 92,5° prawy: 92,5° 	lewy: 101,8° prawy: 101,8° 	lewy: 96,1° prawy: 96,1° 

12	<p>lewy: <math>71,2^\circ</math>  prawy: <math>71,2^\circ</math></p> 	<p>lewy: <math>92,8^\circ</math>  prawy: <math>92,8^\circ</math></p> 	<p>lewy: <math>101,7^\circ</math>  prawy: <math>101,7^\circ</math></p> 	<p>lewy: <math>96,0^\circ</math>  prawy: <math>96,0^\circ</math></p> 
----	--	--	---	--