

Univerzita Pardubice

Fakulta Chemicko-Technologická

Fyzikálně-chemická charakterizace tobolek připravených technikou FDM 3D  
tisku

Diplomová práce

2024

Monika Miklová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Miklová**  
Osobní číslo: **C22291**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Fyzikálně-chemická charakterizace tobolek připravených technikou FDM 3D tisku**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte stručnou literární rešerši na téma: přehled metod výroby, použití a aplikací tobolek připravených metodou 3D tisku. Zaměřte se také na možnosti jejich charakterizace pomocí spektrálních a mikroskopických technik.
2. Připravte tobolky z vláken vybraných biopolymerů technikou FDM 3D tisku.
3. Proveďte charakterizaci připravených tobolek metodami mikroskopie a vibrační spektroskopie.
4. Na základě experimentálních dat proveďte porovnání tobolek z různých materiálů.
5. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.**  
Katedra fyzikální chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Tomáš Pekárek, Ph.D.**  
Zentiva, k.s., Praha

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Fyzikálně-chemická charakterizace tobolek připravených technikou FDM 3D tisku jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 24. 4. 2024

Monika Miklová

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Aleně Komersové, Ph.D. za odborné konzultace a příležitost podílet se na projektu s využitím FDM 3D při přípravě pevných lékových forem. Velké poděkování patří také Ing. Tomáši Pekárkovi, Ph.D. ze společnosti Zentiva, k.s. za odbornou erudici, množství cenných a inspirativních rad, podnětů a flexibilitu ohledně konzultací této práce. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině za psychickou i finanční podporu po celou dobu mého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací pevných lékových forem, konkrétně tobolek připravených metodou FDM 3D tisku. Pro přípravu tobolek byly využity biodegradabilní polymery na bázi polysacharidů. Testovány byly vzorky extrudované a tištěné z čistého Affinisol, Affinisol s příměsí 10 % pektin citrátu a Affinisol s příměsí 10 % alginátu sodného. Byly charakterizovány extrudované filamenty i výsledné tištěné tobolky prostřednictvím 3D a 2D optické mikroskopie, infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, Ramanovy spektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. Na snímcích skenovací elektronové mikroskopie byla také provedena rozměrová analýza pozorovaných vzorků.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

3D tisk, FDM, Affinisol, pektin citrát, alginát sodný, optická mikroskopie, skenovací elektronová mikroskopie, infračervená spektroskopie, Ramanova spektroskopie, rozměrová analýza, fekální bakterioterapie

## **TITLE**

Physico-chemical characterization of capsules prepared using the FDM 3D printing technique.

## **ANNOTATION**

This master thesis deals with the characterization of solid dosage forms, specifically capsules prepared by FDM 3D printing. Biodegradable polysaccharide-based polymers were used for the preparation of capsules. Samples extruded and printed from pure Affinisol, Affinisol with 10% pectin citrate and Affinisol with 10% sodium alginate were tested. The extruded filaments and the resulting printed capsules were characterized by 3D and 2D optical microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy and scanning electron microscopy. The scanning electron microscopy images were also used for dimensional analysis of the observed samples.

## **KEYWORDS**

3D printing, FDM, Affinisol, pectin citrate, sodium alginate, optical microscopy, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, dimensional analysis, fecal bacteriotherapy

## OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ.....	1
SEZNAM TABULEK.....	4
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	5
ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1 3D tisk ve farmacii v posledních letech .....	16
1.1.1 Aprecia Pharmaceuticals - ZipDose®.....	17
1.1.2 FabRx - M3DIMAKER™.....	17
1.1.3 Merck .....	18
1.1.4 Triastek, Inc. – MED®.....	18
1.2 Vliv 3DP na životní prostředí .....	20
1.3 Schválené léčivé přípravky vyrobené metodou 3D tisku .....	22
1.4 Perorální pevné lékové formy.....	24
1.4.1 Druhy perorálních pevných lékových forem.....	24
1.4.2 Porovnání tvrdých a měkkých želatinových tobolek .....	24
1.4.2.1 Měkké želatinové tobolky.....	25
1.4.2.2 Tvrdé tobolky.....	25
1.4.3 Enterosolventní tobolky .....	26
1.4.4 Způsob uvolňování účinné látky z perorálních pevných lékových forem .....	26
1.4.4.1 Perorální lékové formy s prodlouženým uvolňováním .....	27
1.4.4.2 Perorální lékové formy se zpožděným uvolňováním .....	27
1.4.4.3 Variabilita pH GIT a vliv na rozpouštění léčiva .....	28
1.5 Metodologie FMT v porovnání s potenciální medikací .....	30
1.5.1 FMT v posledních let .....	30
1.5.2 Postup FMT při léčbě CDI .....	30
1.6 Analýza a charakterizace tobolek a filamentů .....	32



1.6.1	Mikroskopické metody.....	32
1.6.2	Spektroskopické metody .....	34
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
2.1	Cíle práce.....	36
2.2	Použité chemikálie .....	37
2.2.1	Chemikálie pro přípravu vzorků.....	37
2.3	Použité přístroje a pomůcky .....	37
2.4	Použitý software.....	37
2.5	Experimentální postupy.....	38
2.5.1	Příprava vzorků pro SEM.....	38
2.5.2	Příprava vzorků pro pozorování optickým mikroskopem.....	38
2.5.3	Pozorování vzorku optickým mikroskopem a rozměrová analýza.....	38
2.5.4	Pozorování vzorků SEM .....	39
2.5.5	Infračervená a Ramanova spektroskopie .....	39
3	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	41
3.1	Charakterizace filamentů a tobolek.....	41
3.1.1	2D optická mikroskopie .....	41
3.1.2	3D optická mikroskopie .....	45
3.1.3	SEM.....	48
3.1.4	Rozměrová analýza .....	51
3.1.5	IČ spektroskopie .....	56
3.1.6	Ramanova spektroskopie.....	60
4	ZÁVĚR.....	64

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek č. 1: Kvantifikace metod 3D tisku pro přípravu orálních pevných lékových forem (FDM – Fused Deposition Modeling, SLS - Selective Laser Sintering, SLA – Stereolitografický tisk, 3DP – 3D tisk) <sup>[2]</sup> .....	17
Obrázek č.2: Tablety s Braillovým písmem a měsíčními vzory pro pacienty se zrakovým postižením <sup>[7]</sup> .....	18
Obrázek č.3: Spotřeba energie a vypočtené emise CO <sub>2</sub> pro tiskárny v pohotovostním režimu po dobu jedné hodiny. Uvedena je i spotřeba energie přídatných zařízení. (SLA – Stereolitographic printing, FDM – Fused Deposition Modeling, DIW – direct ink writing, DPE – direct powder extrusion, SLS – Selective Laser Sintering, <sup>[10]</sup> .....	20
Obrázek 4: Měkké želatinové tobolky <sup>[18]</sup> .....	25
Obrázek 5: Tvrdé tobolky – obrázek ilustruje výrobu z přírodních materiálů <sup>[18]</sup> .....	26
Obrázek 6: Rozdíl uvolňování účinné látky u léků s prodlouženým a zpožděným uvolňováním. <sup>[20]</sup> .....	28
Obrázek 7: Snímání vzorku pomocí 3D optického mikroskopu <sup>[30]</sup> .....	33
Obrázek 8: (zleva) Schéma bodového mapování, liniového mapování a spektroskopického zobrazování. Je znázorněno rozložení složky, kde vysoká koncentrace je dána červenou barvou a nízká koncentrace je znázorněna jako modrá/zelená oblast. <sup>[37]</sup> .....	34
Obrázek 9: Michelsonův interferometr <sup>[37]</sup> .....	35
Obrázek 10: Vzorky připravené pro SEM, potažené vrstvou platiny o tloušťce 2 nm .....	38
Obrázek 11: Horní řada zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou – zvětření 1x; spodní řada – totožné pořadí – zvětšení 10x .....	42
Obrázek 12: Horní řada zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou – zvětření 1x; spodní řada – totožné pořadí – zvětšení 10x .....	43
Obrázek 13: Horní řada zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou – zvětření 1x; spodní řada – totožné pořadí – zvětšení 10x .....	44
Obrázek 14: Snímek filamentu z Affinisolu, vlevo zvětšení 10x, vpravo zvětšení 40x .....	45
Obrázek 15: Snímek filamentu ze směsi Affinisolu s 10 % Alginátu sodného, vlevo zvětšení 10x, vpravo zvětšení 40x .....	46
Obrázek 16: Snímek filamentu ze směsi Affinisolu s pektin citrátem, vlevo zvětšení 10x, vpravo zvětšení 40x .....	47
Obrázek 17: Vzorky připravené z Affinisolu; Zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou .....	48

Obrázek 18: Vzorky připravené z Affinisolu s příměsí 10 % alginátu sodného; Zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou .....	49
Obrázek 19: Vzorky připravené z Affinisolu s příměsí 10 % pektin citrátu; Zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou .....	50
Obrázek 20: Přiblížení proměřovaných parametrů v rámci rozměrové analýzy na snímcích z OM (AFF + 10 % ALG). Zleva – šířka filamentu, příčný řez tobolkou – tloušťka stěny tobolky, podélný řez tobolkou – tloušťka stěny tobolky .....	51
Obrázek 21: Vlevo – kruhový útvar jednoho patra; vpravo – výška jednotlivých vrstev .....	53
Obrázek 22: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (AFF_SUR_AVRG); po první extruzi – červeně (AFF_FIL_AVRG); po druhé extruzi – světle modře (AFF_TOB_AVRG)	57
Obrázek 23: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka).....	57
Obrázek 24: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka).....	58
Obrázek 25: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka).....	59
Obrázek 26: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka).....	59
Obrázek 27: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka).....	60
Obrázek 28: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka).....	61
Obrázek 29: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka).....	61
Obrázek 30: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka) .....	62
Obrázek 31: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka) .....	62

Obrázek 32: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka) .....63

Obrázek 33: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka) .....63

## SEZNAM TABULEK

Tabulka č.1: Přehled současných 3D tištěných perorálních lékových forem <sup>[12]</sup> .....	23
Tabulka 2: Význam zkratkách využívaných v rámci experimentální části práce.....	41
Tabulka 3: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených parametrů vzorků (Obrázek 20) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie.....	52
Tabulka 4: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených parametrů vzorků (Obrázek 21) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie.....	52
Tabulka 5: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených hodnot vzorků (Obrázek 20) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie.....	53
Tabulka 6: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených hodnot vzorků (Obrázek 20) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie.....	54
Tabulka 7: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených parametrů vzorků (Obrázek 21) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie.....	55
Tabulka 8: Shrnutí výsledků pro průměr filamentů.....	64
Tabulka 9: Souhrn všech výsledků naměřených v rámci rozměrové analýzy pro tloušťku stěny tobolek.....	65

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D OM	2D optická mikroskopie
3D OM	3D optická mikroskopie
3DP	3D tisk
Affinisol	Afnisol™ HPMC HME 15LV
API	Active Pharmaceutical Ingredient – aktivní farmaceutická substance
CDI	Rekurentní klostridiová kolitida (Clostridium difficile infection)
FMT	Fekální bakterioterapie (Fecal microbiota transplantation)
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FDM	Fused Deposition Modeling (Tavené depoziční modelování)
FIH	„First in human“
FTIR	Fourier transform infrared (spectroscopy), IČ spektroskopie s Fourierovou transformací
GIT	Gastrointestinální trakt
GMP	Good Manufacturing Practice (Správná výrobní praxe – SVP)
HME	Hot Melt Extrusion
HPMC	Hypromelóza
IČ/IR	Infračervená spektroskopie (Infrared spectroscopy)
LF	Léková forma
MED	Melt Extrusion Deposition
MSUD	Leucinóza
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SLA	Stereolitografický tisk
SLS	Selective Laser Sintering

## ÚVOD

Tato diplomová práce vznikla v návaznosti na mou bakalářskou práci z roku 2022 s názvem Využití FDM 3D tisku při přípravě pevných lékových forem. Práce je rozdělena na několik na sebe navazujících kapitol. V úvodu rešeršní části jsou představeny inovace a pokroky v oblasti 3D tisku pevných lékových forem v posledních letech a schválené tištěné léčivé přípravky. Současně je zmíněna také metoda fekální bakterioterapie v souvislosti s potenciálním využitím enterosolventních tobolek na místo současné metody fekální bakterioterapie prováděné prostřednictvím kolonoskopie.

Další částí této diplomové práce je porovnání metod optické a skenovací elektronové mikroskopie, 3D mikroskopie, infračervené a Ramanovy spektroskopie v souvislosti s analýzou a fyzikální a chemickou charakterizací extrudovaných filamentů a 3D tištěných tobolek. Homogenita tištěných tobolek i extrudovaného vlákna je klíčovou informací k dalšímu vědeckému výzkumu a dosažení reprodukovatelnosti této metody pro přípravu pevných lékových forem v komerčním měřítku.

Pro získání komplexních informací o fyzikálních a chemických vlastnostech extrudovaných filamentů a tištěných tobolek bylo v rámci experimentální části práce využito několik optických a spektrálních metod a provedena rozměrová analýza vzorků.

Níže uvedený text a obsah diplomové práce bude zaměřen především na metodu FDM (Fused Deposition Modeling) 3D tisku neboli metodu vytlačování filamentu v kombinaci s HME (Hot Melt Extrusion – vytlačováním za tepla), a to pevných lékových forem. Podrobněji byly jednotlivé druhy 3D tisku použitelné pro tisk lékových forem vysvětleny v rámci mé bakalářské práce viz. citace č. 1. Důvodem zaměření práce na výše zmíněnou metodu FDM 3D tisku v kombinaci s HME je její souvislost s projektem zabývajícím se vývojem tobolek, které by v budoucnu potenciálně mohly sloužit jako alternativa k současným metodám léčby dysfunkční střevní mikroflóry prostřednictvím fekální bakterioterapie.

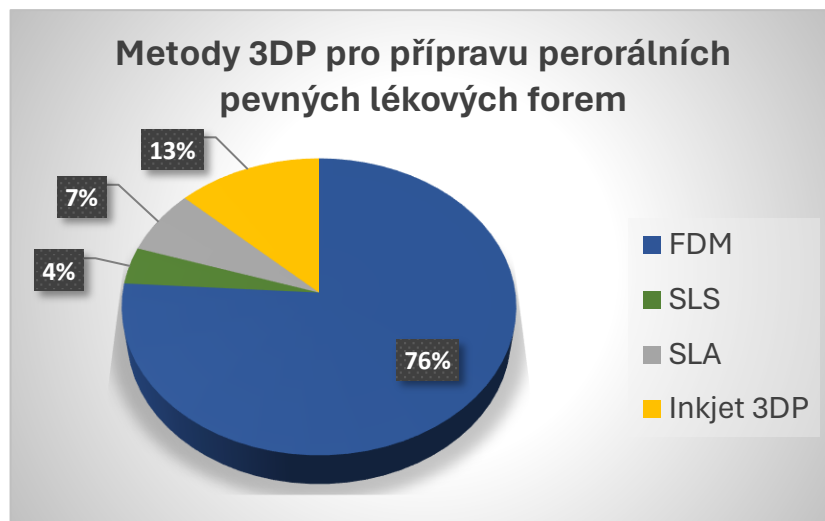
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 3D tisk ve farmacii v posledních letech

Metoda FDM (Fused Deposition Modeling) 3D tisku neboli metoda vytlačování filamentu za horka je jednou z nejrozšířenějších a nejpoužívanějších metod 3D tisku využívaných k přípravě pevných lékových forem. Jednotlivé metody 3D tisku a jejich procentuální zastoupení pro přípravu pevných lékových forem znázorňuje Obrázek 1. V posledních letech je velmi zmiňovaným tématem optimalizace tisku.<sup>[2,3]</sup> Zmíněná optimalizace a dosažení efektivních podmínek přípravy tablet a tobolek je krokem k reprodukovatelným výsledkům. Výzkumy se zabývají zlepšením podmínek tisku v závislosti na vytlačování materiálu z trysky tiskárny nebo nanášením jednotlivých vrstev pro docílení pozitivního vlivu na výslednou lékovou formu.

Podmínky, které jsou nastaveny pro nanášení jednotlivých vrstev jsou zásadní pro jejich vzájemnou přilnavost a pro výslednou pevnost produktu.<sup>[2]</sup> V případě, že je obsluhou tiskárny v softwaru nastaven tisk vrstev v příliš velkých rozestupech, dojde následně ke vzniku drobných mezer a tobolka tak ztratí svou kompatibilitu a pevnost, což následně ovlivní také disoluční chování účinné látky obsažené v kapsli při průchodu trávicím traktem. Jsou-li na druhou stranu rozestupy vrstev nastaveny v příliš malých intervalech, dojde k deformaci navrženého tvaru, zesílení stěn tobolky a opět k nepříznivému ovlivnění disolučních vlastností lékové formy. Z výše uvedeného vyplývá, že nejenom druh a vlastnosti materiálu, ale také podrobné nastavení tiskárny je nezbytné k dosažení příznivých výsledků.<sup>[4]</sup> V případě, že jsou podmínky tisku vhodně nastaveny, poskytuje 3D tisk farmaceutickým vědcům nástroj pro vytvoření funkčního systému pro podávání léčiv nad rámec možností současných metod a umožňuje přizpůsobit systém podávání prakticky jakémukoli požadovanému farmakokinetickému profilu, který odpovídá klinickým potřebám pacienta.<sup>[5]</sup> V následujících kapitolách uvedu kromě technologických inovací v oblasti 3D tisku léčivých přípravků také společnosti, které za těmito pokroky stojí.





Obrázek č. 1: Kvantifikace metod 3D tisku pro přípravu orálních pevných lékových forem (FDM – Fused Deposition Modeling, SLS - Selective Laser Sintering, SLA – Stereolitografický tisk, 3DP – 3D tisk) <sup>[2]</sup>

#### 1.1.1 Aprecia Pharmaceuticals - ZipDose®

Mezi firmy zabývající se 3D tiskem v oblasti personalizovaných léčivých přípravků patří Aprecia Pharmaceuticals sídlící v americké Pennsylvánii. Aprecia Pharmaceuticals je spojena s takzvanou ZipDose® technologií, kdy bylo jejich hlavním cílem zajistit jednodušší užívání léků a snížit počet tablet jednotlivých přípravků, které pacient k léčbě potřebuje. Zmíněná ZipDose® technologie umožní podání vysoké dávky účinné látky (až 1000 mg) v jedné tabletě a zároveň je takto připravená kapsle rozpustná v malém množství vody. ZipDose® technologie byla využita firmou Aprecia Pharmaceuticals při výrobě léčivého přípravku s názvem Spritam, který byl také v roce 2015 schválen americkou FDA a znamenal tak průlom 3D tisku v oblasti farmaceutických přípravků. O tomto léku bude ještě bližší zmínka v kapitole 1.3. s názvem Schválené léčivé přípravky připravené metodou 3DP (3D tisku). <sup>[6]</sup>

#### 1.1.2 FabRx - M3DIMAKER™

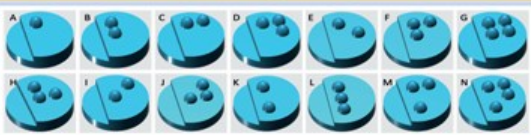
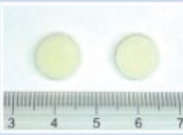
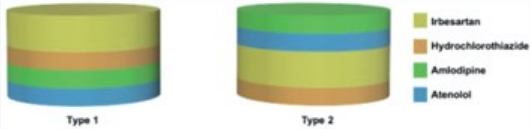
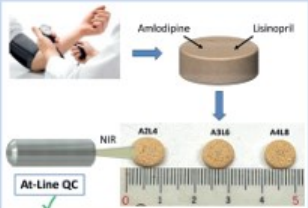
Další společností přispívající k rozvoji 3DP v oblasti farmaceutického průmyslu je londýnská firma FabRx založena v roce 2014. <sup>[7]</sup> Tato společnost se v lékařském a farmaceutickém prostředí proslavila představením první farmaceutické 3D tiskárny určené pro personalizovanou medicínu a umožnila tak tisk léčivých přípravků na míru jednotlivým pacientům. Tiskárna nese název M3DIMAKER™ a na trh byla uvedena v roce 2020. <sup>[7,8]</sup>

Pomocí své technologie vytvořil FabRx mimo jiné také řadu vysoce flexibilních léčivých přípravků s přizpůsobenými tvary, barvami, příchutěmi, dávkováním i profily uvolňování. Jako příklad lze uvést tablety s Braillovým písmem a měsíčním vzorem, které jsou znázorněny na Obrázku 2. Jedná se o inovativní způsob při výrobě léku pro pacienty se zrakovým postižením,

kterým tento koncept přináší větší nezávislost a redukuje množství chyb při podávání léků. Bylo navíc prokázáno, že i přes přítomnost vzorů si tablety Printlets™ zachovávají své původní mechanické vlastnosti. Mimo jiné se FabRx zabývá také výrobou takzvaných Polypills, které kombinují několik účinných látek v jedné tabletě a zredukuje tak pacientovi s komplikovaným režimem léčby množství užívaných medikamentů.<sup>[6,8]</sup> Produkce Polypills nebo-li léčiv s fixní dávkovou kombinací není omezena pouze na výrobu metodou 3DP, ale dnešní době existuje široké spektrum těchto léčiv vyráběných běžnými postupy. Mluvíme například o léčbě silných bolestí (kombinace tramadolu a paracetamolu), hypertenze (kombinace hydrochlorothiazidu a ramiprilu) a dalších.<sup>[9]</sup>

Tiskárna je navíc využitelná během celého časového horizontu vývoje léčiv od výzkumu, předklinických studií až ke klinickým zkouškám FIH („First-in-human“).<sup>[8]</sup> Podrobněji budou schválené 3D tištěné přípravky uvedeny v Tabulce 1 v kapitole 1.3. Schválené léčivé přípravky vyrobené metodou 3D tisku.

Obrázek č.2: Tablety s Braillovým písmem a měsíčními vzory pro pacienty se zrakovým postižením. Převzato z [7]

Description	Image	Reference
3D printed tablets with Braille and Moon patterns for visual impairment		9
3D printed tablets with opioid abuse-deterrent properties		10
Four layered polypill in two conformations		12
Dose verification of 3D printed antihypertensive polypills		13

### 1.1.3 Merck

K bio farmaceuticky významným společnostem zabývajícím se výrobou pevných lékových forem prostřednictvím 3D tisku patří také německá společnost Merck, která v roce 2020 oznámila spolupráci s APMC (sesterskou společností EOS Med Chem CO.,Ltd), jež je celosvětovým poskytovatelem řešení v oblasti 3D tisku. Cílem této spolupráce je vyvinout 3D tištěné tablety nejprve pro klinické účely a následně v komerčním měřítku pro širokou veřejnost a posunout tak současné hranice v oblasti personalizované medicíny.<sup>[6]</sup>

### 1.1.4 Triastek, Inc. – MED®

V neposlední řadě je nutné zmínit také společnost Triastek, Inc., která je globálním lídrem v oblasti 3D tisku farmaceutických přípravků s 41 patenty, které tvoří více než 20 % veškerých farmaceutických aplikací 3D tisku. Podnik Triastek, Inc. vstoupil na trh s vlastní technologií

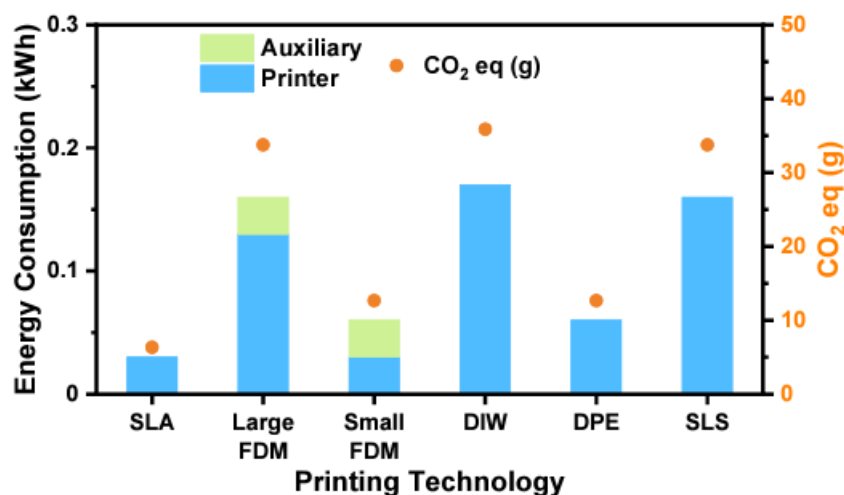
MED® (Melt Extrusion Deposition) díky níž vyvíjí své vlastní léky. Technologie MED® dokáže ve srovnání s FDM 3D tiskem zpracovávat práškové API (aktivní farmaceutická substance) a farmaceutické pomocné látky přímo bez nutnosti přípravy filamentu. <sup>[5,6]</sup> Stejně jako FDM 3D, MED tisk umožňuje přípravu tobolek různých rozměrů a s různou geometrií. Tyto faktory také souvisejí s nástupem účinku přípravku, dobou působení a celkovou interakcí s lidským organismem. <sup>[6]</sup>

Byla provedena studie v souladu s GMP a technologie MED® byla v roce 2020 přijata do programu FDA Emerging Technology Program a dva z tištěných léků byly vybrány pro výzkumné účely. Prvním z těchto léků je chronoterapeutický lék na revmatoidní artritidu, kdy je lék pacientem užíván před spaním, ale nástup jeho účinků je žádoucí až v časných ranních hodinách, kdy vrcholí bolest a ztuhlost kloubů a uvolňování je tedy zpožděno. Druhým lékem s výše uvedeným povolením je léčivý přípravek pro kardiovaskulární poruchy a poruchy srážlivosti krve. V tomto případě je iniciativa vývojářů zaměřena na náhradu léku podávaného dvakrát denně do formy jednodávkové tablety. Dále je snaha zlepšit biologickou dostupnost léků v rámci celého gastrointestinálního traktu dosažením přesného cílení na orgány a programovaného uvolňování léků. <sup>[5,6]</sup>

## 1.2 Vliv 3DP na životní prostředí

Dopad farmaceutického průmyslu na životní prostředí spočívá především v produkci oxidu uhličitého do ovzduší, jež je nejvíce produkovaným skleníkovým plynem přispívajícím ke globálnímu oteplování a prohlubování ozonové díry v atmosféře. Z tohoto důvodu je často zmiňován pojem „uhlíková neutralita“, jež označuje rovnováhu mezi množstvím oxidu uhličitého uvolněného do atmosféry a množstvím z ní odstraněného. [10]

Farmaceutický průmysl je v tomto ohledu obrovským producentem uvedeného nežádoucího plynu. Uvádí se, že výrobou léčivých přípravků je produkováno o 55 % emisí uhlíku více než je produkováno automobilismem. [10] Z tohoto důvodu jsou vítány inovativní možnosti produkce lékových forem, které by byly k životnímu prostředí šetrnější a přispěly by tak k uhlíkové neutralitě. Mezi tyto metody patří i 3D tisk. Jedná se stále o poměrně novou výrobní metodu, proto zde oblast dopadu na životní prostředí není dokonale prozkoumána a zpracována. Můžeme ovšem prezentovat informace získané během posledních let, které poskytují povzbudivé výsledky a potvrzují, že 3DP může produkovat kvalitní léky především v oblasti personalizované medicíny, aniž by poškozoval životní prostředí takovou měrou jako současné farmaceutické výrobní technologie. [10]



Obrázek č.3: Spotřeba energie a vypočtené emise CO<sub>2</sub> pro tiskárny v pohotovostním režimu po dobu jedné hodiny. Uvedena je i spotřeba energie přídatných zařízení. (SLA – Stereolitografická tiskárna, FDM – Fused Deposition Modeling, DIW – direct ink writing, DPE – direct powder extrusion, SLS – Selective Laser Sintering, Převzato z [10])

Na druhou stranu má ale i 3DP jisté nevýhody ve vztahu k životnímu prostředí, které je třeba brát v potaz. Jedná se především o emise vznikající při tisku. Velké množství tiskáren využívá jako primární stavební materiál pro přípravu filamentů plasty a jejich tavení během výrobního

procesu může do ovzduší uvolňovat škodlivé chemické látky. Řešení tohoto problému může být realizováno využitím biopolymerů pro přípravu filamentů, přičemž některé z nich (např. HPMC) jsou předmětem studia v rámci experimentální části této diplomové práce. Druhým problémem 3DP v oblasti poškozování životního prostředí je fakt, že některé 3D tiskárny vyžadují pro svůj provoz velké množství energie a v případě, že je využívána energie z jiných, než obnovitelných zdrojů, může proces tisku přispívat ke změně klimatu. V tomto případě se nabízí jako řešení vyvíjení metod, které jsou schopny uskutečnit tisk při nižších teplotách. <sup>[10]</sup>

### 1.3 Schválené léčivé přípravky vyrobené metodou 3D tisku

Personalizovaná medicína, jež je hlavním zájmem 3D tisku, má obrovský význam především u pediatrické a geriatrické populace, kdy je často dávkování výrazně ovlivněno individuální situací a potřebami každého pacienta, což je velký problém u léků s úzkým terapeutickým oknem. Současné tradiční postupy výroby léčivých přípravků jsou v tomto směru neefektivní a součástí přípravy medikace pacientovi je tedy často ruční zpracování jednotlivé dávky (tzn. mletí, drcení, vážení) a může tak zvýšit riziko chyby v medikaci a její nekonzistentnost.

Průlomovým rokem v oblasti tisku léčivých přípravků byl jednoznačně rok 2015, kdy došlo k prvnímu oficiálnímu schválení 3D tištěného přípravku s názvem Spritam (levetiracetam), jež představuje perorální lékovou formu k léčbě různých druhů epileptických záchvatů u pacientů od 4 let. Přípravek je na předpis a lze jej také užívat v kombinaci s jinými medikamenty. <sup>[6]</sup>

Za bližší zmínku stojí také využití technologie FabRx k tisku personalizovaných pilulek pro děti s vzácnou metabolickou poruchou odborně nazývanou jako Leucinóza (MSUD) laicky pojmenovanou jako nemoc z javorového sirupu. Jedná se o onemocnění způsobené poruchou zpracování rozvětvených aminokyselin, které se běžně vyskytují v bílkovinné potravě (leucin, izoleucin, valin). Kvůli snížené schopnosti zpracování zmíněných rozvětvených AMK (aminokyselin) dochází v organismu k jejich nahromadění a jelikož je množství, ve kterém se v organismu vyskytují velice individuální, musí být také léčba přísně přizpůsobena několika faktorům pacienta jako je například věk, hmotnost a koncentrace AMK. Primární léčbou je dieta se striktním omezením leucinu ve stravě doplněna o suplementaci izoleucinu a valinu v přesně stanovených dávkách pro správný vývoj organismu. <sup>[8,11,13]</sup> V současnosti se léky připravují manuálně, což je metoda časově náročná a nákladná a může docházet k častějšímu kolísání plazmatické koncentrace účinné látky v důsledku chyb při přípravě dávky. <sup>[6,11]</sup>

Velký zájem o 3D tisk v oblasti farmaceutické praxe v posledních letech reflektuje Tabulka 1, v níž jsou shrnuty současně tištěné lékové formy.

Tabulka č.1: Přehled současných 3D tištěných perorálních lékových forem <sup>[12]</sup>

Model Drug	Dosage Form	3D printing technique
Felodipine	Microspot formulations	Inject printing
Guaifenesin	Controlled-release bilayer tablet	Extrusion-based 3D printing
Fluorescein	Tablet	FDM
Prednisolone	Extended-release tablet	FDM
Paracetamol	Oral device	FDM
Ramipril Pravastatin sodium	Polypill	Extrusion-based 3D printing
Budesonide	Controlled-release tablets	FDM
Paracetamol 4-ASA	Oral modified release Dosage forms	Stereolithographic (SLA) 3D printing
Theophylline Dipyridamole Diclofenac sodium Theophylline	Shell-core delayed release tablet	FDM
Paracetamol Caffeine	Patient-specific immediate release tablet Caplets	FDM
Ropinirole	Tablet	Inject printing
Dipyridamole	Gastro-floating tablet	Extrusion-based 3D printing
Theophylline 5-ASA Captopril Prednisolone Aripiprazole	Patient-tailored immediate-release tablets Orodispersible films	FDM
Deflazacort	A tablet loaded with polymeric nano capsules	FDM
Domperidone	The intragastric-floating delivery system	FDM
Hydrochlorothiazide	Tablet	FDM
Acetaminophen	Multicompartment capsular devices for two-pulse oral drug delivery	FDM
Fenofibrate	Tablet	Inject printing
Hydrochlorothiazide	Channeled tablet	FDM
Acetaminophen	Capsular device	FDM

## 1.4 Perorální pevné lékové formy

Podání účinné látky je v dnešní době možné provést několika způsoby prostřednictvím takzvané lékové formy (Dosage form). Volba vhodné lékové formy je v praxi ovlivněna několika aspekty od charakteru onemocnění přes specifika jednotlivých pacientů (pohlaví, věk, zdravotní stav, těhotenství) až po farmakokinetické a farmakodynamické chování léčiva v organismu. <sup>[14,15]</sup> Na základě výsledného použití fekální bakterioterapie bylo pro tuto studii zvoleno jako nejvhodnější perorální podání účinné látky. Konkrétně perorální pevná léková forma a následující text na ni bude zaměřen.

### 1.4.1 Druhy perorálních pevných lékových forem

K nejpoužívanějším pevným lékovým formám řadíme:

- Tablety – pevné výlisky různých tvarů, které se připravují lisováním granulátů či práškových směsí
- Tvrdé želatinové tobolky – jsou tvořeny dvoudílným pouzdem (tělo a víčko) a plněny například peletami, granulátem nebo práškovou směsí složenou z API a dalších pomocných látek
- Měkké želatinové tobolky – oproti tvrdým želatinovým tobolkám jsou plněny emulzemi, roztokem či suspenzí API s nevodným rozpouštědlem (ve většině případů se jedná o olej)
- Želatinové perly – obdoba měkkých želatinových tobolek s tím rozdílem, že lipofilní roztok API je dávkován do hydrogelu želatiny
- Obdukety – představují obalené tablety; k obalení se využívají různé materiály jako například sacharóza (v tomto případě se tabletám říká dražé) nebo různé druhy polymerů
- Čípky (24upositoria) – podlouhlé lékové formy určené k zavádění do tělních dutin (konečník, pochva) <sup>[16]</sup>

### 1.4.2 Porovnání tvrdých a měkkých želatinových tobolek

Tobolky se využívají především k perorálnímu užití a jsou připravovány plněním směsí účinné látky s vhodnými pomocnými látkami do prázdných kapslí. Kapsle je schopna maskovat nežádoucí chuť či zápach. Toho lze mimo jiné dosáhnout také potahováním tablet či vhodnou volbou blistru. Tobolky lze rozdělit do dvou základních kategorií na měkké želatinové kapsle a tvrdé tobolky. Jejich formulace je přibližena na Obrázku 4 a 5. <sup>[17]</sup>



#### 1.4.2.1 Měkké želatinové tobolky

Hlavním rozdílem oproti tvrdým tobolkám je forma, kterou se obal plní. Měkké tobolky jsou většinou plněny tekutým, polotekutým roztokem či suspenzí. Ve většině případů se jedná o různé oleje a jak obal, tak vnitřní náplň obsahuje API. Ve srovnání s tvrdými tobolkami jsou snadno rozpustné v žaludečních šťávách a mají tedy rychlejší nástup účinku, což nemusí být vždy žádoucí. [17]



Obrázek 4: Měkké želatinové tobolky. Převzato z [18]

Díky želatinovému obalu jsou tedy vhodné k podávání léčivých látek, které jsou v nízkých dávkách rozpustné v tucích nebo kapalná farmaceutika nerozpustná ve vodě. Želatinové kapsle lze připravit jako léčiva s enterosolventním povlakem, zpožděným, prodlouženým nebo naopak okamžitým uvolňováním. Naproti tomu je k výrobě měkkých želatinových tobolek potřeba specializované zařízení a problém může nastat při přípravě tobolek léčiv s využitím extrémně ve vodě rozpustných a hydrolyzovatelných chemikálií. Důvodem je jejich nízká stabilita. [17,18]

#### 1.4.2.2 Tvrdé tobolky

Tento druh tobolek je plněn účinnou látkou spolu s excipienty převážně ve formě suchého prášku a na rozdíl od měkkých tobolek, kde je obal tvořen jednotným obalem, se tvrdá tobolka skládá ze dvou částí (tělo a víčko). [18]

Velkou výhodou je variabilita plnění kapslí různými systémy od pelet, granulí, prášků až po polotuhé látky, což souvisí i s možností přípravy lékové formy s modifikovaným uvolňováním při použití plnicího systému perličkového typu. [17,18] Většinou bývají tvrdé tobolky využívány také pro rané části výzkumů a klinických studií především díky své jednoduchosti a možné rychlé změny formulace v oblasti přípravy v počátečních fázích výzkumu. [19]

K výrobě velké většiny tobolek se stále využívají různé typy želatiny (typ A a typ B), ale v závislosti na trendech posledních let je stále rostoucí zájem o tobolky vyráběné bez živočišných zdrojů pro vegetariánský/veganský trh. V tomto případě je želatina nahrazena materiálem rostlinného původu, kdy mezi nejoblíbenější patří HPMC (Hydroxypropylmethyl celuloza), pullulan a tobolky na bázi škrobu.<sup>[19]</sup> Využití rostlinných polysacharidů má také svůj praktický význam ve snižování náchylnosti k degradaci tvrdých<sup>[17]</sup> tobolek vlivem kolísání vlhkosti a sniží tak potřebu přísné kontroly skladovací teploty. Mimo jiné nejsou tvrdé tobolky vhodné k podání vysoce rozpustných solí jako jsou chloridy, bromidy a jodidy.<sup>[17,19]</sup>



*Obrázek 5: Tvrdé tobolky – obrázek ilustruje výrobu z přírodních materiálů. Převzato z [18]*

#### 1.4.3 Enterosolventní tobolky

Enterosolventní tobolky se vytváří aplikací enterosolventního povlaku na jinak běžně užívané tobolky. Jak už z názvu vyplývá, jedná se o tobolky uzpůsobené k uvolňování účinné látky ve střevě, aby nedošlo k dezintegraci tobolky již v kyselém prostředí žaludku.<sup>[18,19,20,21]</sup> Existuje široké spektrum materiálů k výrobě enterosolventních povlaků např. mastné kyseliny, vosky, plasty a rostlinná vlákna. Protože je kladen důraz na bezpečnost lékových forem, je žádoucí se vyhýbat například materiálům obsahujícím ftaláty. Mezi konkrétní příklady přírodních polysacharidů využívaných pro přípravu enterosolventních potahů řadíme chitosan, algináty, pektiny a další.<sup>[18,19]</sup>

#### 1.4.4 Způsob uvolňování účinné látky z perorálních pevných lékových forem

Uvolňování účinné látky z perorálních lékových forem může probíhat okamžitě nebo řízeně. V případě řízeného uvolňování existuje několik dalších variant (prodloužené, zpožděné a pulzní uvolňování).<sup>[20,22]</sup>

Lékové formy s řízeným uvolňováním mají v porovnání s klasickými léky tyto výhody:

- Stabilnější hodnoty plazmatické koncentrace a prodloužení terapeutického účinku

- Minimalizace nežádoucích účinků
- Doprava léčiva na místo účinku v organismu
- Zvýšení komfortu pacienta v důsledku menší frekvence podávání léčiva [20-23]

Na druhou stranu tento typ LF obsahuje větší množství účinné látky a problém tak může nastat v případě, kdy je poškozena vnější struktura a dojde k uvolňování účinné látky najednou. V důsledku toho může být koncentrace léčiva v organismu toxická. [23]

#### **1.4.4.1** *Perorální lékové formy s prodlouženým uvolňováním*

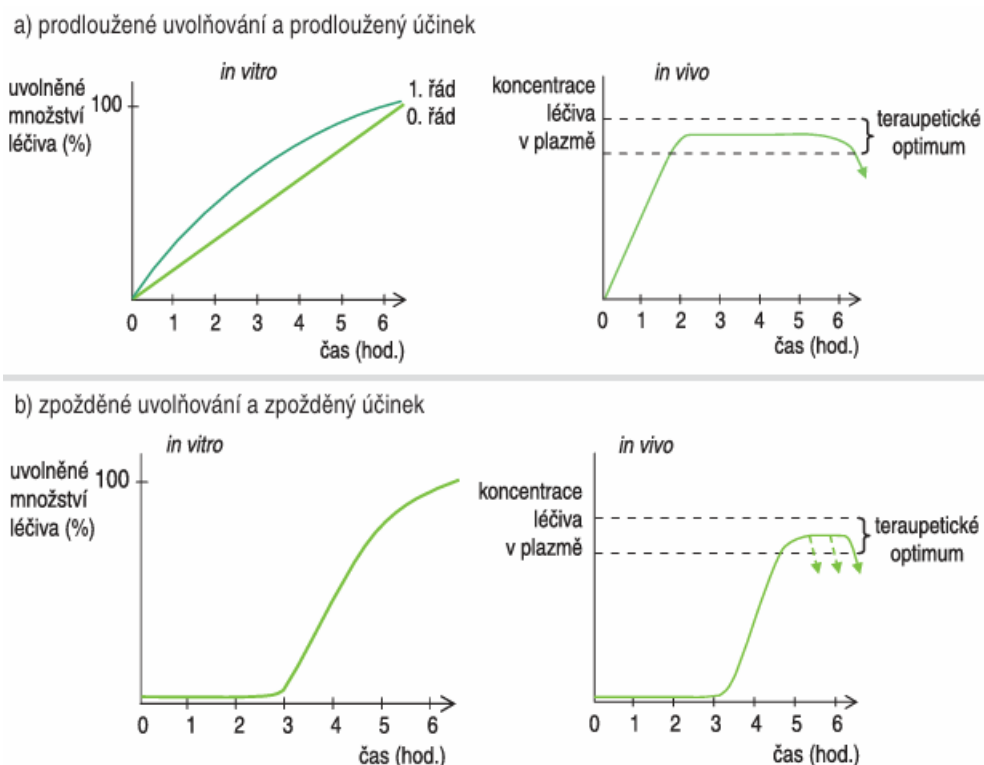
Prodloužené uvolňování účinné látky lze zajistit buď potahem zpomalujícím rozpouštění lékové formy nebo takzvanými matricovými tabletami. Matricové tablety jsou složeny z nosné pomocné látky, (podle které dále rozlišujeme druhy matricových tablet), účinné látky a případně dalších excipientů. Na základě vlastností nosné pomocné látky tedy rozlišujeme polymerní nerozpustné matricové tablety, lipofilní matricové tablety a hydrofilní gelové matrice. [20,23]

Pro potřeby uvolňování účinné látky ve střevní části trávicího traktu jsou vhodné hydrofilní matricové tablety, kde jsou nosnými pomocnými látkami biodegradabilní polymery na bázi derivátů celulózy. Mezi nejpoužívanější patří díky svým vlastnostem deriváty HPMC jako například Affinisol, [20,23] který byl použit pro 3D tisk testovaných tobolek v rámci experimentální části.

#### **1.4.4.2** *Perorální lékové formy se zpožděným uvolňováním*

Zpožděného uvolňování účinné látky se běžně dosahuje prostřednictvím enterosolventních potahů lékových forem (tzv. enterosolventní lékové formy), které byly blíže popsány v kapitole 1.4.3. [20,21]

Hlavní výhody a důvod používání lékových forem se zpožděným uvolňováním jsou stejné jako u léků s prodlouženým uvolňováním. Rozdílem je způsob uvolňování účinné látky v organismu, který prezentuje Obrázek 6. V případě LF se zpožděným uvolňováním prochází léčivo trávicím traktem a k uvolňování účinné látky dochází až ve střevní oblasti GIT v závislosti na vyšší hodnotě pH. Naproti tomu LF s prodlouženým uvolňováním uvolní iniciativní dávku po požití a následně dochází k postupnému a konstantnímu uvolňování účinné látky v průběhu průchodu trávicím traktem. [20,21,23]



Obrázek 6: Rozdíl uvolňování účinné látky u léků s prodlouženým a zpožděným uvolňováním. Převzato z [20]

Zpožděného uvolňování je možné využít hned z několika důvodů. Konkrétně jako prevenci před podrážděním žaludeční sliznice v důsledku užívání některých léčivých přípravků, např. NSAID (nesteroidní protizánětlivá léčiva), k zabránění degradaci acidolabilních léčiv v kyselých žaludečních šťávách a v neposlední řadě pro lokální léčbu střevních onemocnění [20,21] jako například v případě rekurentní klostridiové kolitidy (CDI), která bude blíže vysvětlena v kapitole 1.5.

#### 1.4.4.3 Variabilita pH GIT a vliv na rozpouštění léčiva

Na základě několika provedených studií (např. studie se systémem InteliCap® [24], studie SmartPill® s 215 zdravými dobrovolníky [25]) bylo prokázáno, že hodnoty pH trávicího traktu jsou velmi variabilní. A to ne pouze v rámci jednotlivých částí GIT, ale také v závislosti na fyziologických vlastnostech různých jedinců. Tento poznatek je důležitou informací v rámci výroby léčivých přípravků s řízeným uvolňováním. [24,25,26]

Vyskytuje se velké množství faktorů, jimiž je ovlivněno rozpouštění a eliminace perorálních lékových forem v rámci průchodu GIT. Kromě vlivu požití potravy nebo vlastností samotných LF se jedná především o interindividuální variabilitu fyziologických vlastností. Konkrétně je tedy farmakokinetická variabilita léčiv ovlivněna například hodnotou pH žaludku a dobou tranzitu (vyprazdňování), rozdíly mezi pohlavími, rozdíly mezi geriatrickou a pediatrickou

populací, chirurgickými změnami v GIT či variabilitou faktorů tlustého střeva (mikrobiom, tranzitní čas, složení tekutin).<sup>[24,25,26]</sup>

Hodnoty pH trávicího traktu mají zásadní vliv na biologickou dostupnost, distribuci léčiva a rychlost jeho eliminace v organismu. Z tohoto důvodu se u léčivých přípravků zjišťuje takzvaný koncentrační profil, který je popsán pomocí základních farmakokinetických parametrů (distribuční objem, clearance, plocha pod křivkou, poločas rozpadu...)<sup>[27]</sup>

## 1.5 Metodologie FMT v porovnání s potenciální medikací

Pod zkratkou FMT se ukrývá druh léčby s názvem fekální bakterioterapie, která je využívána při léčbě rekurentní klostridiové kolitidy (CDI). V současnosti představuje experimentální léčebnou metodu, která je pro pacienty poměrně nepříjemná a pro transplantační středisko komunikačně náročná. [28,29]

### 1.5.1 FMT v posledních letech

V posledních letech došlo ke značnému nárůstu onemocnění s názvem rekurentní klostridiová kolitida (CDI). K rozšíření této nemoci přispělo mimo jiné i nadměrné užívání antibiotik s širokým spektrem účinku. V důsledku toho došlo k postupnému zvyšování rezistentnosti bakterií způsobujících CDI a následnému genetickému přenosu z generace na generaci. [28,29] Poměrně znepokojivým faktem je také závažný průběh u značného množství pacientů a zvýšení úmrtnosti v důsledku tohoto onemocnění. Během CDI dochází k silnému poškození střevního mikrobiomu, a proto, že jedním z důvodů jejího rozšíření jsou právě antibiotika, není příliš vhodné je použít v rámci terapie samostatně. [29] V souvislosti s tím došlo k nárůstu zájmu o léčbu tohoto onemocnění inovativními způsoby a v roce 2009-2010 byla v České republice poprvé zavedena do praxe fekální bakterioterapie (FMT). Za tímto úspěchem stojí skupina infektologů z Fakultní nemocnice v Brně. [28]

### 1.5.2 Postup FMT při léčbě CDI

V obecném principu se v rámci FMT jedná o transplantaci stolice vhodného dárce pacientovi s rekurentní klostridiovou kolitidou pomocí nazogastrické sondy nebo kolonoskopie, kdy dochází k využití neškodných komenzálních bakterií k vytlačení patogenních mikroorganismů. Transplantaci stolice je možné provést jak přes horní část GIT, tak přes dolní část. [29]

Způsoby provedení FMT lze rozdělit na dva rozdílné principy, kdy v prvním případě je dárce příbuzná osoba (příbuznou osobou zde rozumíme jak člověka geneticky příbuzného, tak především člověka žijící ve stejné domácnosti). V případě, že stolicí daruje příbuzná osoba, je velká pravděpodobnost, že i střevní mikroflóra bude podobná, a tedy vhodná pro dárce. Navíc se v tomto případě eliminuje riziko přenosu infekce. Další variantou je transplantace střevní mikroflóry od univerzálního dárce, kde je ovšem nutné jeho podrobnější vyšetření a vyskytuje se zde i zvýšené riziko rozšíření infekce. [28]

FMT je zdlouhavý proces prováděný poměrně nepříjemnou metodou (nazogastrická sonda, kolonoskopie), který vyžaduje krátkodobou hospitalizaci pacienta. Navíc se jedná o logisticky a komunikačně komplikovaný zákrok, kdy je v ideálním případě nutné zajistit transplantaci

stolice do 6 h od defekace (poté klesá množství prospěšných bakterií střevní mikroflóry).<sup>[28]</sup> FMT je také stále alternativní formou léčby s jistou mírou recidivy (v závislosti na přesném provedení metody kolem 12 %).<sup>[29]</sup> Z těchto důvodů existuje silný zájem k nalezení méně invazivní a snadno proveditelné metody. Například tedy formou užívání perorálních léků.

Z hlediska individuálního průběhu CDI ale nejsou současné výrobní metody lékových forem dostatečně flexibilní a ekonomické pro přípravu malého množství medikamentů. Problém personalizace dávek jednotlivým pacientům řeší právě 3D tisk, který umožňuje v krátkém časovém intervalu modifikovat podmínky tisku a množství připravených tobolek. Navíc v porovnání s klasickými postupy výroby léčiv ekonomicky výhodněji.<sup>[2]</sup>

## 1.6 Analýza a charakterizace tobolek a filamentů

Pro analýzu vzorků v pevném stavu existuje několik vhodných analytických metod, mezi které patří například 3D optická mikroskopie, SEM (skenovací elektronová mikroskopie), Ramanovo nebo infračervené mapování. Všechny zmíněné metody byly vybrány jako vhodné k charakterizaci a zjištění homogenity filamentů i výsledných tobolek 3D tisku. Jedná se o metody nedestruktivní a u vzorků je tedy zachována původní chemická i fyzikální struktura. V případě SEM je nutné pozorované vzorky naprášit vrstvou ušlechtilého kovu (např. Pt) či uhlíku, aby nedocházelo k jejich nabíjení [30]

### 1.6.1 Mikroskopické metody

Podstatným parametrem mikroskopických metod je takzvaná rozlišovací schopnost, která udává schopnost mikroskopu rozlišit od sebe dva body a je ovlivněna několika veličinami popsanými v Rovnici 1. Z Rovnice 1 také vyplývá, že čím kratší je vlnová délka zdroje světla, tím lepší rozlišovací schopnost mikroskop má. [30]

$$\alpha = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{A} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin a}$$

$\alpha$  Rozlišovací schopnost

$\Lambda$  Vlnová délka

A Numerická apertura

n Index lomu

a Polovina otvorového úhlu kužele světla

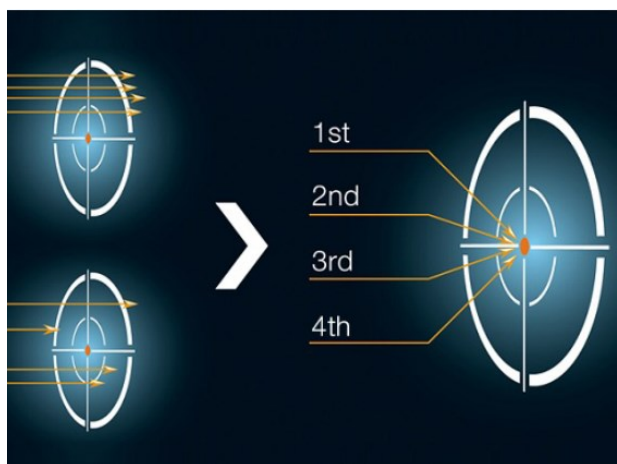
*Rovnice 1: Výpočet rozlišovací schopnosti mikroskopu*

### 3D optická mikroskopie

Tato metoda slouží k mikroskopickému pozorování vnější struktury vzorku s využitím fotonů. Přesto, že rozlišovací schopnost je zde podstatně horší (1-10 mikronů) [31], než v případě elektronové mikroskopie, má oproti ní velkou výhodu. Pro pozorování objektu 3D optickou mikroskopií není třeba vzorek nijak upravovat a objekty se zobrazují barevně. Klasická optická mikroskopie (2D) je díky malému zaostřovacímu poli poměrně nevhodná pro pozorování drsných či zakřivených vzorků, a proto jsou využívány rekonstrukce doplněné o třetí rozměr (3D), při kterých přístroj spojuje dohromady více snímků, aby se zvýšila hloubka ostrosti. [30,31]



3D optická mikroskopie je svou podstatou stejná jako klasická (2D) optická mikroskopie, kdy je snímání vzorků v ose x a y doplněno o snímání v ose z. Způsob snímání vzorku ilustruje Obrázek 7. [30]



Obrázek 7: Snímání vzorku pomocí 3D optického mikroskopu. Převzato z [30]

### **SEM – Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie**

Skenovací elektronový mikroskop funguje na obdobném principu jako optický mikroskop. S tím rozdílem, že místo fotonů využívá k zobrazení vzorků fokusovaný svazek elektronů. Dalším rozdílem oproti optické mikroskopii je zobrazování vzorků v odstínech šedi a daleko vyšší rozlišovací schopnost. [30]

Jedná se o mikroanalytickou techniku, jejíž proces je realizován ve vakuu a tím jsou podpořeny rozptylové procesy na povrchu vzorku. Při analýze je získán obraz sekundárních elektronů, díky čemuž je pozorovatel schopen hodnotit morfologii, pórovitost a detaily povrchu vzorku v nano měřítku. [33,34]

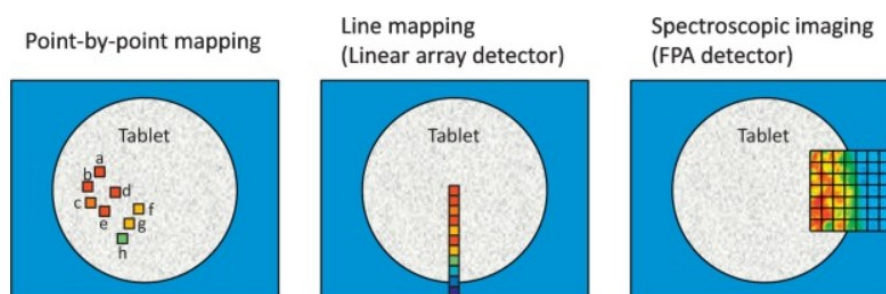
V oblasti 3D tištěných léčivých přípravků je SEM často využívanou metodou pro charakterizaci extrudovaných filamentů i výsledných tištěných tobolek. [34,35] Díky této metodě je možné získat informace o reologických vlastnostech pozorovaného objektu a charakterizovat tak jednotlivá vlákna či tištěné tobolky v jejich průřezu. Využití má metoda především při charakterizaci produktů 3D tiskáren založených na nanášení vrstev (např. FDM, SSE), kde poskytuje informace o depozici jednotlivých vrstev, jejich rovnoměrnosti v porovnání s teoretickým průměrem trysky a splynutí mezi vrstvami. Všechny tyto informace jsou důležité pro formulátory při optimalizaci reologických vlastností filamentů a mechanických vlastností finální lékové formy. [30,33,34]

### 1.6.2 Spektroskopické metody

Jedná se o metody využívající pro analýzu vzorků zdroje světla o různých vlnových délkách, na základě kterých pak rozlišujeme druhy spektroskopických měření, např. Ramanova, infračervená spektroskopie. Spektroskopické metody lze využít jak ke kvantitativní analýze, jejímž základem je Lambertův-Beerův zákon, tak pro kvalitativní analýzu. Kvalitativní měření spočívá v identifikaci nebo charakterizaci látek v analyzovaném vzorku na základě jejich charakteristických vlastností, např. IČ spektroskopie – absorpce IČ záření a charakterizace na základě poloh absorpčních maxim. [36-38]

IČ i Ramanova spektroskopie jsou metody rutinně využívané pro analýzu farmaceutických formulací od fází vývoje až po charakterizaci výsledných produktů. V tomto případě je možné na základě naměřených spekter získat informace o chemickém složení vzorků, identifikovat funkční skupiny a určit případné nečistoty. [36,37]

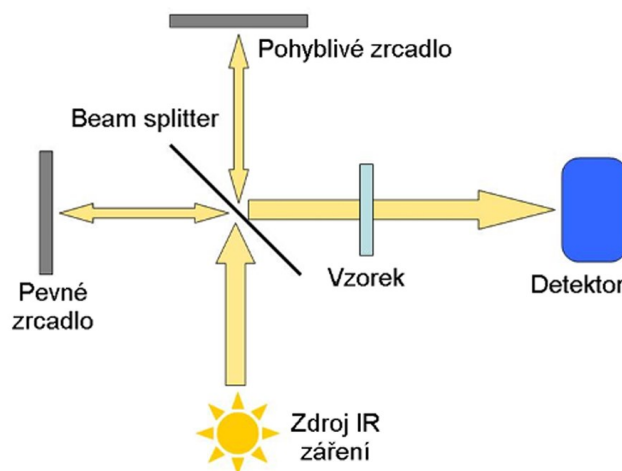
Původní metody IČ a Ramanovy spektroskopie dnes doplňuje spektroskopické zobrazování a mapování, díky kterému získáme informace o prostorovém zastoupení jednotlivých látek ve vzorku. Různé způsoby mapování vzorku jsou schematicky přiblíženy na Obrázku 8. [37]



Obrázek 8: (zleva) Schéma bodového mapování, liniového mapování a spektroskopického zobrazování. Je znázorněno rozložení složky, kde vysoká koncentrace je dána červenou barvou a nízká koncentrace je znázorněna jako modrá/zelená oblast. Převzato z [37]

### Infračervená spektroskopie

Jak již z názvu vyplývá, metody využívají jako zdroj světla infračervené záření vznikající změnami elektromagnetického pole vyvolané pohybem molekul. Nejpoužívanějších metod infračervené spektroskopie je metoda FTIR (Fourier Transform InfraRed) spektroskopie, jejímž základním prvkem je Michelsonův interferometr. Princip jeho fungování je znázorněn na Obrázku 9. [37,38]



Obrázek 9: Michelsonův interferometr. Převzato z [37]

FTIR spektroskopické zobrazování se ukázalo jako účinný přístup při aplikacích ve farmaceutickém průmyslu. Mluvíme například o charakterizaci změn strukturních forem API, [37] dále v souvislosti se studii zaměřujícími se na rozpouštění léčivých přípravků v závislosti na pH trávicího traktu, kde byly v rámci studie [39] sledovány změny struktury ibuprofenu vyrobeného z HPMC matric. [39]

### Ramanova spektroskopie

Tato spektroskopická analytická metoda doplňuje informace získané prostřednictvím FTIR, jelikož obě metody studují vibrace molekul. Zatímco FTIR spektroskopie měří absorpci dopadajícího záření způsobenou molekulárními vibracemi, Ramanova spektroskopie je založena na Ramanově jevu. Zjednodušeně řečeno se jedná o energetický přechod molekuly mezi dvěma jejími vibračními hladinami. K rozšíření Ramanovy spektroskopie v analýze léčiv přispěl cenová dostupnost této metody a rozvoj laserů v posledních letech. Prostřednictvím Ramanovy spektroskopie jsme schopni s vysokým rozlišením objasnit chemickou strukturu vzorku. [37,38]

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat strukturu a chemické složení filamentů pro přípravu tobolek prostřednictvím alternativní metody 3D tisku na FDM tiskárně Original Prusa i3 MK3S a také výsledných tobolek. Tobolky byly připraveny z těchto materiálů: Affinisol (AFF), Affinisol + 10 % alginát sodný (AFF-ALG) a Affinisol + 10 % pektin citrát (AFF-PECC) a potenciálně by měly sloužit jako enterosolventní perorální pevné lékové formy pro léčbu onemocnění spojených s poruchou střevní mikroflóry, např. CDI. Tobolky by tak měly nahradit metodu fekální bakterioterapie zprostředkovanou prostřednictvím rektální transplantace.

Studie byla provedena za účelem charakterizace fyzikálních a chemických vlastností extrudovaných filamentů a výsledných tobolek a zjištění vlivu vysoké teploty při extruzi na zmíněné filamenty a tobolky. Byla také provedena rozměrová analýza, která poskytuje informace nezbytné k posouzení reprodukovatelnosti přípravy lékových forem metodou FDM 3D tisku.

Pro pozorování struktury a charakterizaci homogenity jednotlivých vzorků byly použity mikroskopické i spektrální metody.

## 2.2 Použité chemikálie

### 2.2.1 Chemikálie pro přípravu vzorků

- alginic acid sodium salt (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA / product of Denmark)
- Affinisol HPMC HME 15 LV (DuPont, s. r. o., Specialty Electronic Materials Switzerland GmbH, Luzern, Švýcarsko)
- pectin from citrus peel (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA / product of Denmark)
- parafín

### 2.3 Použité přístroje a pomůcky

- extrudér Noztek Touch (Noztek, Shoreham, UK)
- FDM 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S (Prusa Research a.s., Praha, ČR)
- analytické váhy KERN ALT 310-4AM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- homogenizátor Mixer Mill MM200 (Retsch GmbH, Haan, Německo)  
homogenizační nádoba (komůrka mlecí 10 ml, nerez. Ocel) pro MM200
- 3D optický mikroskop Olympus DSX1000 (Evident, Tokio, Japonsko)
- skenovací elektronový mikroskop Tescan Clara (Carlyle Group, Washington D.C., USA), detektor Ultim Max EDS 65 (High Wycombe, UK)
- IČ spektrometr Nicolet iS50 (Thermo scientific, Waltham, USA)
- Ramanův spektrometr InVia Reflex (Renishaw, Wotton-under-Edge, UK)
- mikrotom Leica HistoCore AUTOCUT - Automated Rotary Microtome RM2255 (Leica Biosystems, Deer Park, USA)
- rotační čerpací zařízení Quorum Q150R ES Plus (Quorum, Laughton, UK)
- běžně používané laboratorní sklo a pomůcky

### 2.4 Použitý software

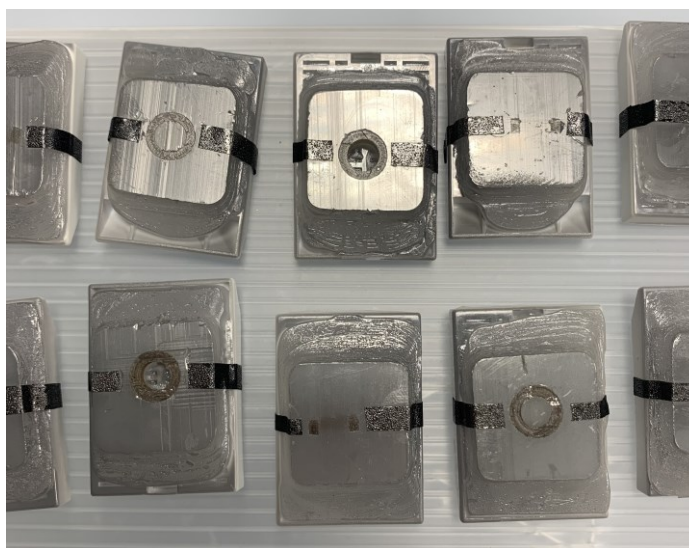
- Autodesk Fusion 360 – návrh 3D tobolek (Autodesk, Inc., San Rafael, USA)
- Prusa slicer – optimalizace podmínek 3DP, export g-kódu (Prusa Research a.s., Praha, ČR)
- Opus – zobrazování a ukládání dat IČ a Ramanovy spektroskopie (Bruker, Billerica, USA)
- Omnic – vyhodnocování dat IČ spektroskopie (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Nikon Imaging Software – rozměrová analýza vzorků (NIS Elements, Praha, ČR)

## 2.5 Experimentální postupy

### 2.5.1 Příprava vzorků pro SEM

Původní vzorky tobolek a filamentů byly nařezány tak, aby bylo následně umožněno pozorovat jejich příčný a podélný řez. Takto nařezané filamenty a tobolky byly zataveny do parafínu. Po zatuhnutí byly umístěny do mikrotomu, kde byla nejprve nastavena tloušťka řezu na 100  $\mu\text{m}$  a s tímto nastavením provedeny 2 – 3 řezy zataveným materiálem. Následně byla tloušťka řezu snížena na 10  $\mu\text{m}$  a provedeny 3 – 4 řezy. Pro každý vzorek byla v mikrotomu vyměněna žiletka, aby se zamezilo případnému poškození materiálu v důsledku její nedostatečné ostrosti.

Pomocí tenkých řezů byly vytvořeny vzorky s rovným povrchem. Takto připravené vzorky byly následně pokryty vrstvou platiny s tloušťkou výsledné vrstvy 2nm. Takto upravené vzorky byly připraveny k pozorování skenovacím elektronovým mikroskopem a jsou zobrazeny na Obrázku 10.



Obrázek 10: Vzorky připravené pro SEM, potažené vrstvou platiny o tloušťce 2 nm

### 2.5.2 Příprava vzorků pro pozorování optickým mikroskopem

Pro pozorování vzorků optickým mikroskopem v režimu 3D byly použity původní vzorky, které nebylo nutné nijak upravovat. V případě 2D optické mikroskopie byly použity vzorky připravované pro SEM před jejich pokovením.

### 2.5.3 Pozorování vzorku optickým mikroskopem a rozměrová analýza

Optickým mikroskopem byly v režimu 2D pozorovány řezy jednotlivými vzorky (vzorky z přípravy pro SEM) se zvětšením 1x a 10x. V nastavení softwaru bylo zvoleno nasvícení vzorku v režimu D-F (dark field) pro tobolky z materiálů Affinisol + 10% PECC, Affinisol +

10% ALG a pro tobolky z čistého Affinisolu byl zvolen režim MIX (kombinace světlého a tmavého pole) z důvodu lepší viditelnosti světlého materiálu.

Následně byla v režimu 3D optické mikroskopie pozorována vnější struktura původních, tedy nijak neupravených vzorků filamentů a výsledných tobolek. Vzorky byly pozorovány při zvětšení 10x a 40x. Od každého vzorku byly pořízeny nejméně 2 fotografie v odlišných místech vzorku.

U všech fotografií pořízených pomocí 2D optické mikroskopie byla provedena rozměrová analýza příčného i podélného řezu tobolkou, tloušťky jednotlivých vrstev tobolky, které jsou na sebe tištěny a podélného řezu filamentů. Z 3D optické mikroskopie byly pro rozměrovou analýzu využity fotografie se zvětšením 10x, u kterých byl proměřován průměr filamentů. Každý vzorek byl změřen 5x v odlišných místech, aby byly získány reprezentativní hodnoty.

#### **2.5.4 Pozorování vzorků SEM**

Snížení tloušťky řezu na 10  $\mu\text{m}$  při přípravě vzorků bylo provedeno proto, aby se docílilo jemnějšího řezu bez případného poškození analyzovaného materiálu, které by mohlo narušit výsledky pozorování.

Pokovené řezy vzorků byly umístěny do vakuové komory skenovacího elektronového mikroskopu, kde byl následně odčerpán vzduch, zapnut elektronový paprsek a seřízena osa z pohyblivého stolku se vzorky. Všechny takto připravené vzorky byly pozorovány vždy ve dvou variantách zvětšení při zvolení stejných podmínek pro každou variantu, aby bylo umožněno srovnání.

První měření: zvětšení 100x, skenovací rychlost 6, skenovací mód OVERVIEW. V tomto případě byly podmínky nastaveny tak, aby byl vzorek snímán jako celek a byla umožněna následná rozměrová analýza pro srovnání s rozměrovou analýzou z 2D optického mikroskopu.

Druhé měření: zvětšení 600x, skenovací rychlost 7, skenovací mód ANALYSIS. Při uvedeném zvětšení bylo možné zaměřit se na podrobnější strukturu jednotlivých částí pozorovaných filamentů a tobolek, kompaktnost materiálu a případné strukturní nedostatky či odchylky.

#### **2.5.5 Infračervená a Ramanova spektroskopie**

Infračervenou a Ramanovou spektroskopií byly měřeny vstupní suroviny a jejich potřebné směsi pro přípravu filamentů a tobolek, vzorky extrudovaných filamentů a tištěných tobolek bez jakékoli úpravy. Každý ze vzorků byl proměřen 3x. Následně byla spektra zprůměrována pro lepší přehlednost.

Z výchozích surovin byl proměřen čistý Affinisol, alginát sodný, pektin citrát, směs Affinisolu s příměsí 10 % alginátu sodného a Affinisolu s příměsí 10 % pektin citrátu. Směs byla připravena s využitím analytických vah.



### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Charakterizace filamentů a tobolek

V následujícím textu bude pro jednoduchost používáno několik zkratk pro analyzované vstupní materiály před extruzí, extrudované filamenty a výsledné tištěné tobolky. Význam těchto zkratk popisuje Tabulka 2. Vzhledem k množství pořízených snímků v rámci experimentálního měření budou v následující části uvedeny pouze vybrané. Kompletní přehled pořízených snímků a získaných dat je uveden v příloze práce formou CD (2D OM obrázky číslo 1 – 46; 3D OM obrázky číslo 47 – 68; SEM obrázky číslo 69 – 106).

Tabulka 2: Význam zkratk využívaných v rámci experimentální části práce

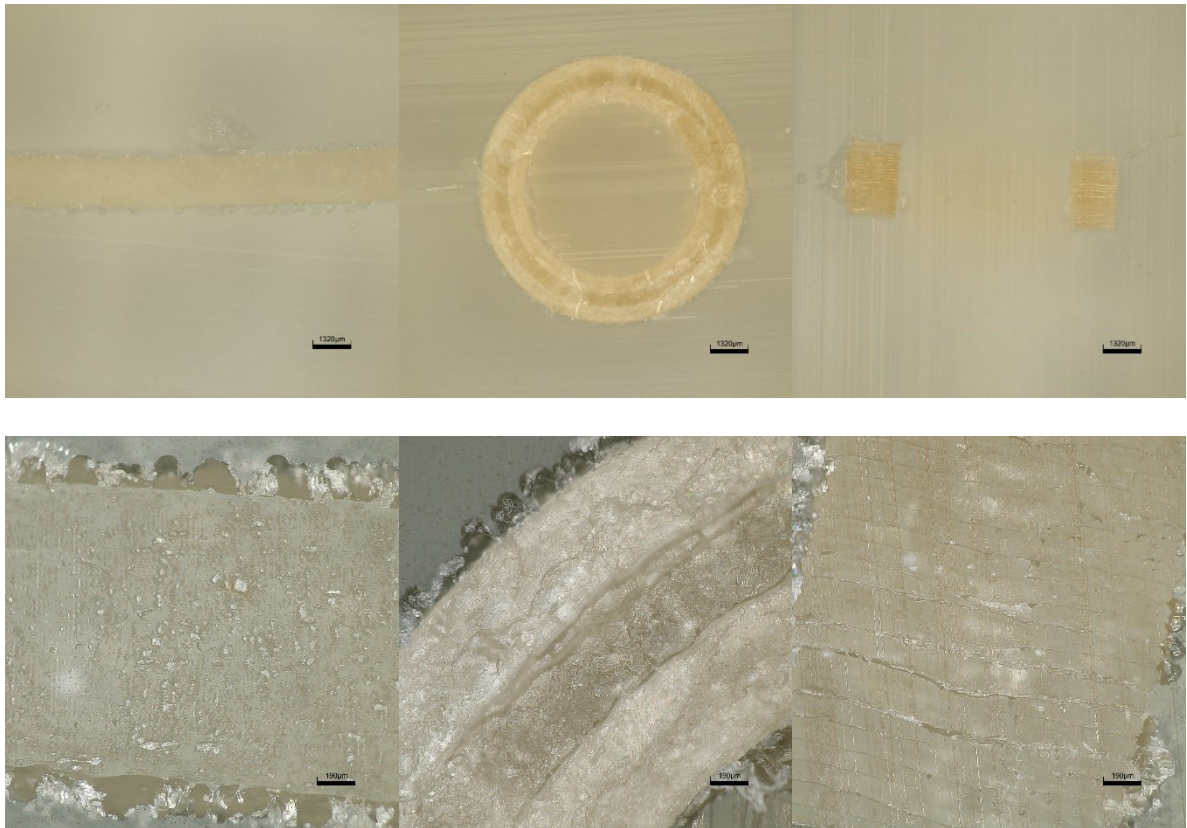
Zkratka	Význam zkratky
AFF	Affinisol HPMC HME 15 LV
AFF + 10 % ALG	Affinisol HPMC HME 15 LV s příměsí 10 % Alginátu sodného
AFF + 10 % PECC	Affinisol HPMC HME 15 LV s příměsí 10 % Pectin z citrusové kůry
SUR	Vstupní surovina pro extruzi filamentů
FIL	Filament
TOB	Tobolka

##### 3.1.1 2D optická mikroskopie

Následující vybrané snímky dávají představu o podrobné struktuře příčných a podélných řezů použitých filamentů a tobolek.

##### **AFF**

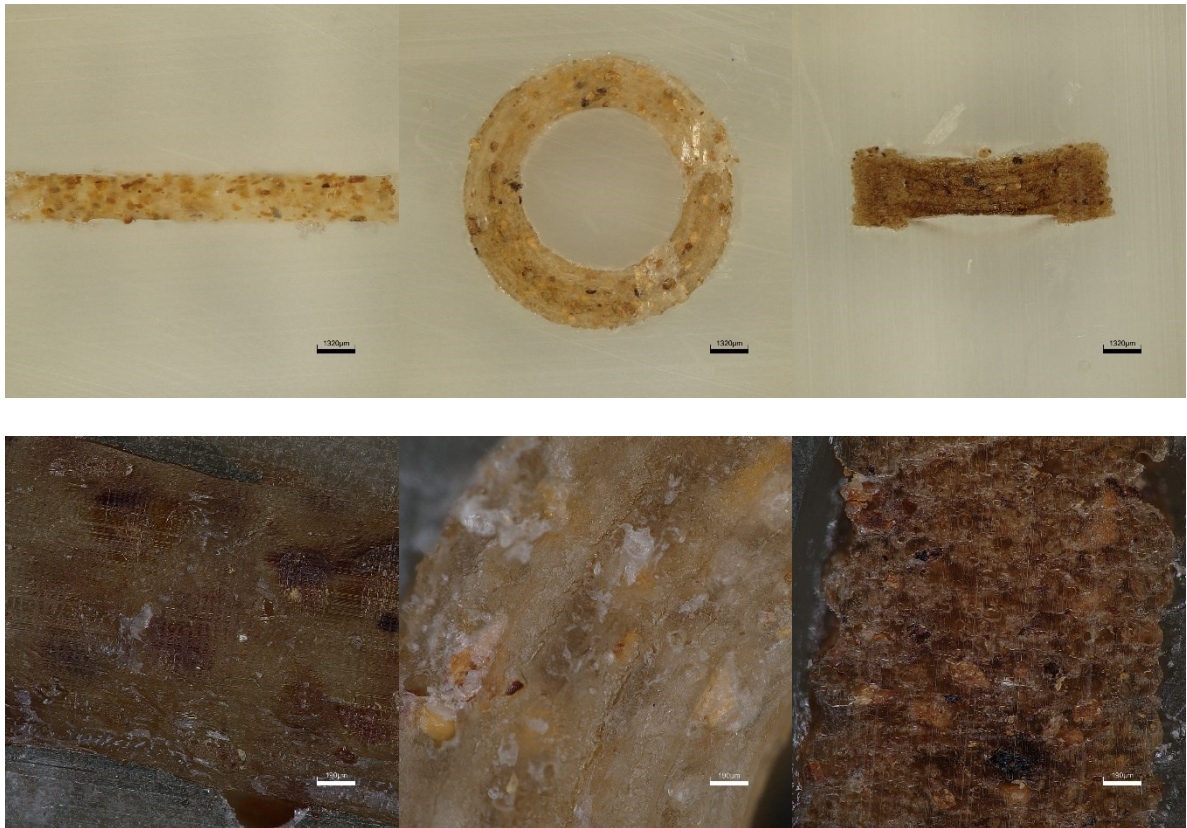
Pořízené fotografie na Obrázku 11 ukazují odlišnost vnitřní struktury AFF tobolky od ostatních použitých materiálů. Čistý Affinisol nevykazuje po první extruzi (filament) žádnou nehomogenitu z hlediska barevné jednotnosti ani při větším zvětšení. Vlákno zůstalo homogenní z hlediska barvy také po druhé extruzi (tištěná tobolka) což je zřetelně vidět na podélném řezu tobolkou při jejím větším přiblížení (spodní řada fotografie vpravo). Největší odlišnost v porovnání s ostatními vzorky se vyskytla v příčném řezu tobolkou (horní řada uprostřed), kdy je na fotografii vidět odlišná středová vrstva. Na podélném řezu tobolkou při zvětšení 10x (spodní řada fotografie vpravo) je také možné vidět strukturu jednotlivých vrstev, které jsou na sebe při procesu tisku nanášeny.



Obrázek 11: Horní řada zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou – zvětšení 1x; spodní řada – totožné pořadí – zvětšení 10x

### **AFF + 10 % ALG**

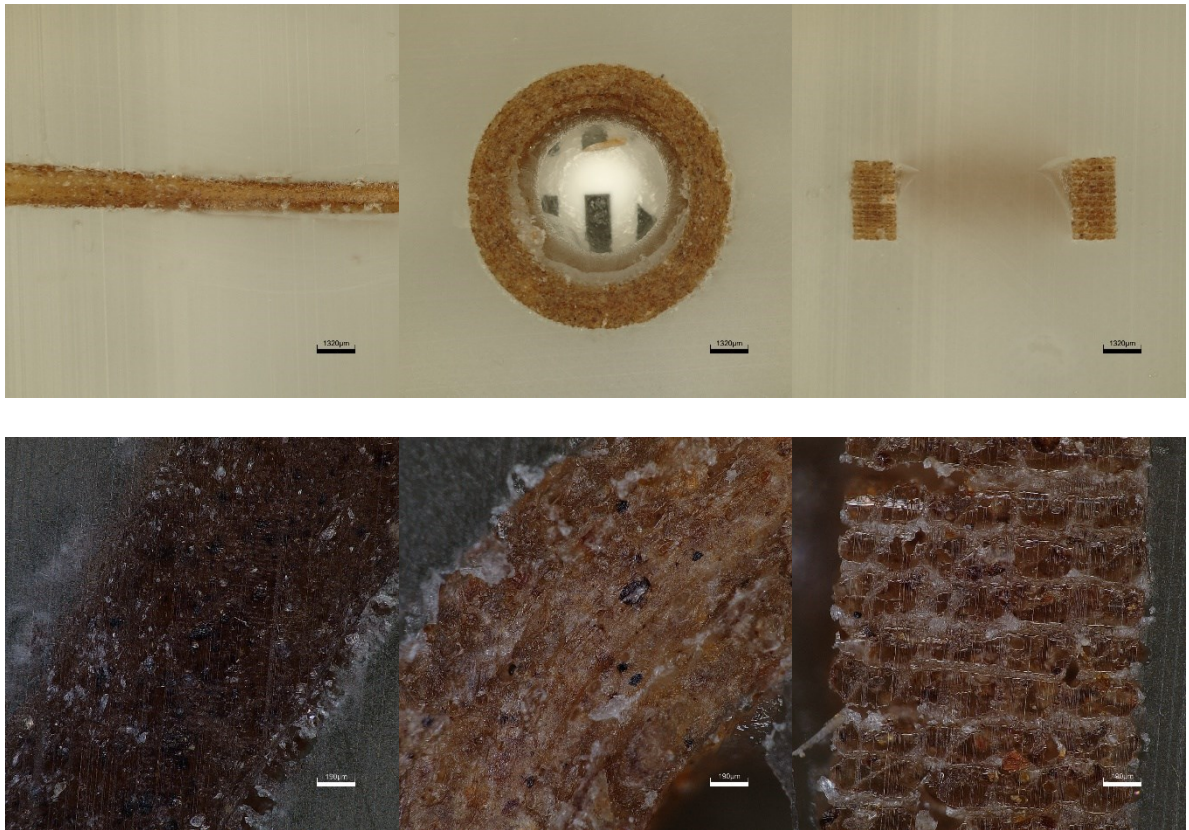
Na snímcích řezů affinisolového filamentu a tobolky s příměsí alginátu sodného na Obrázku 12 jsou již po první extruzi (filament) viditelné drobné skvrny, které mohou být degradačními produkty hypromelózy a jsou momentálně předmětem studie.<sup>[41]</sup> Přesto nejsou podle optického posouzení po druhé extruzi, kdy je materiál ve formě tobolky zřejmě žádné nedostatky týkající se spojitosti jednotlivých tištěných vrstev na sebe (jak na sebe vrstvy naléhají) v podélném řezu (snímky vpravo). Na fotografii ve spodní řadě vpravo, která zobrazuje příčný řez tobolkou při zvětšení 10x nejsou patrné jednotlivé vrstvy, které jsou na sebe při tisku nanášeny. Jsou v tomto případě slity dohromady. Z tohoto důvodu je také nebylo možno proměřit v rámci rozměrové analýzy popsané dále v kapitole 3.1.4. Rozměrová analýza. Naopak příčným řezem (spodní řada uprostřed) při zvětšení 10x je slabě vidět středová kruhová vrstva, která je způsobena tiskem.



Obrázek 12: Horní řada zleva – filament, příčný řez tobolekou, podélný řez tobolekou – zvětšení 1x; spodní řada – totožné pořadí – zvětšení 10x

### **AFF + 10 % PECC**

U affinisolového vlákna s příměsí pektinu došlo ve srovnání s čistým Affinisolem k největší změně barvy k tmavším odstínům a filament je oproti předchozím vzorkům nejméně transparentní. Tuto skutečnost dokládá Obrázek 13. Zároveň je vidět větší homogenita extrudovaného materiálu v porovnání s AFF + 10 % ALG – výskyt drobnějších a více tmavých ploch. Až skoro černá barva tmavých ploch ve struktuře nejlépe viditelná na příčném řezu tobolekou při větším přiblížení (spodní řada uprostřed) může být způsobena tepelnou degradací materiálu, ke kterému dochází při extruzi. Dalším důvodem může být smísení Affinisolu a pektin citrátu. Opět je viditelná přiléhavost jednotlivých vrstev po tisku. Na snímku pořízeném při zvětšení 10x (spodní řada uprostřed a vpravo) je dostatečně zřetelná struktura tisku jednotlivých vrstev pouze v některých částech toboleky. Podrobnější strukturu bylo ale možné vidět díky použití skenovacího elektronového mikroskopu. Tyto snímky jsou součástí kapitoly 3.1.3 SEM. Opět je i u tohoto materiálu viditelná středová vrstva na Obrázku 13 spodní řada uprostřed.



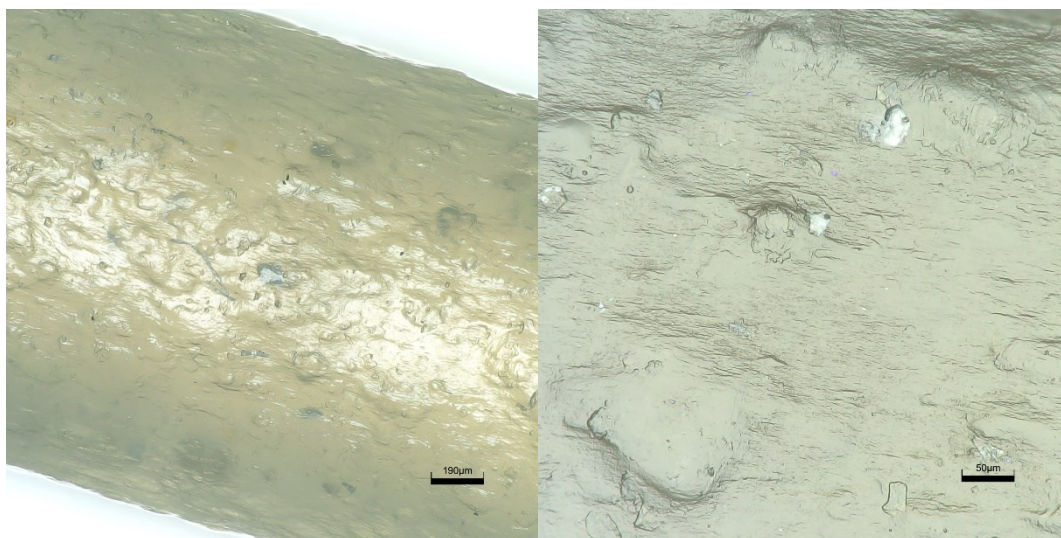
*Obrázek 13: Horní řada zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou – zvětření 1x; spodní řada – totožné pořadí – zvětšení 10x*

Nejzřetelněji ze všech tří testovaných materiálů je vidět středová vrstva u AFF tobolky. Při zvětšení 10x je také patrné, jak na sebe byly jednotlivé vrstvy při tisku nanášeny. Jednotlivé tištěné vrstvy tobolky (podélný řez) naopak nebylo možné pozorovat u vzorků z AFF + 10 % ALG. Zde byly vrstvy slity dohromady. Další výraznou změnou, která se vyskytla u vzorků z AFF + 10 % ALG a u čistého AFF se nevyskytly jsou drobné plochy tmavých odstínů způsobené potenciální degradací materiálu v důsledku vysoké teploty při extruzi. Ze všech tří pozorovaných materiálů měly vzorky z AFF + 10 % PECC nejtmaší barvu a středová linie při příčném řezu tobolkou byla vidět méně zřetelně než u AFF tobolky. Materiál je oproti AFF + 10 % ALG více homogenní při vizuálním pozorování. Neobsahuje takové množství tmavých ploch.

### 3.1.2 3D optická mikroskopie

Součástí vizuální charakterizace filamentů a tištěných tobolek bylo pozorování daných vzorků pod optickým mikroskopem v 3D zobrazení. Každý vzorek byl pozorován pod zvětšením 10x a 40x přičemž byly vždy pořízeny čtyři fotografie struktury materiálu z různých vzorků a v jeho odlišných částech. Pro přehlednost byly do následujícího textu vybrány pouze některé. Všechny pořízené snímky jsou součástí přílohy ve formě CD (obrázky číslo 47 – 68). Vzorky byly pozorovány na průhledném podložním sklíčku určeném pro optickou mikroskopii.

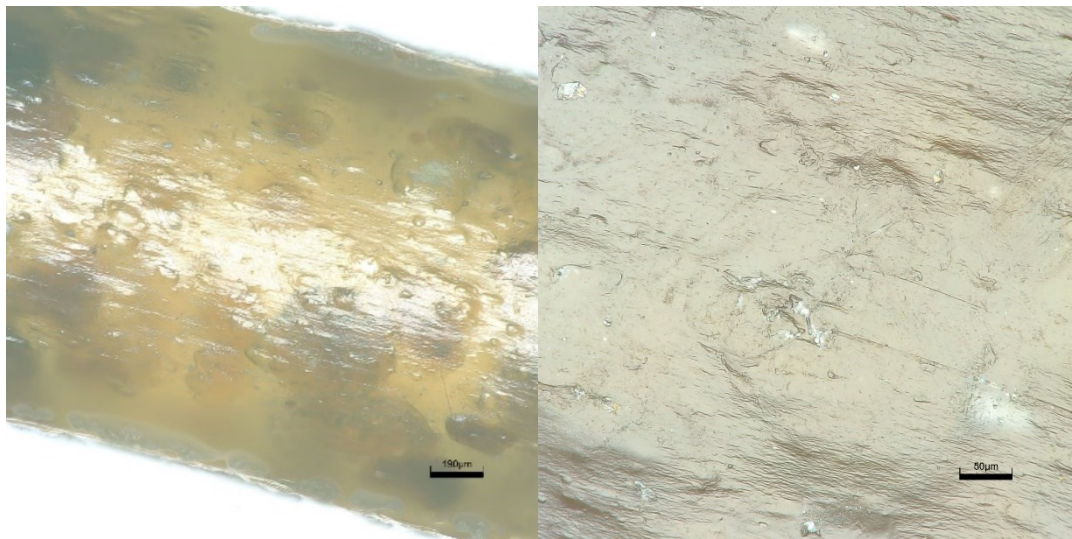
#### AFF



Obrázek 14: Snímek filamentu z Affinisolu, vlevo zvětšení 10x, vpravo zvětšení 40x

Na obrázku 14 vlevo je vidět affinisolové vlákno pozorované optickým mikroskopem v režimu 3D. Jeho struktura není zcela hladká a filament je válcovitého tvaru. Ve struktuře jsou při zvoleném nasvícení vidět drobné skvrny tmavší barvy než je samotné okolní vlákno. Vnější povrch vlákna je více přiblížen na Obrázku 14 vpravo, kdy je při zvětšení 40x podrobněji vidět nerovná (3D) struktura.

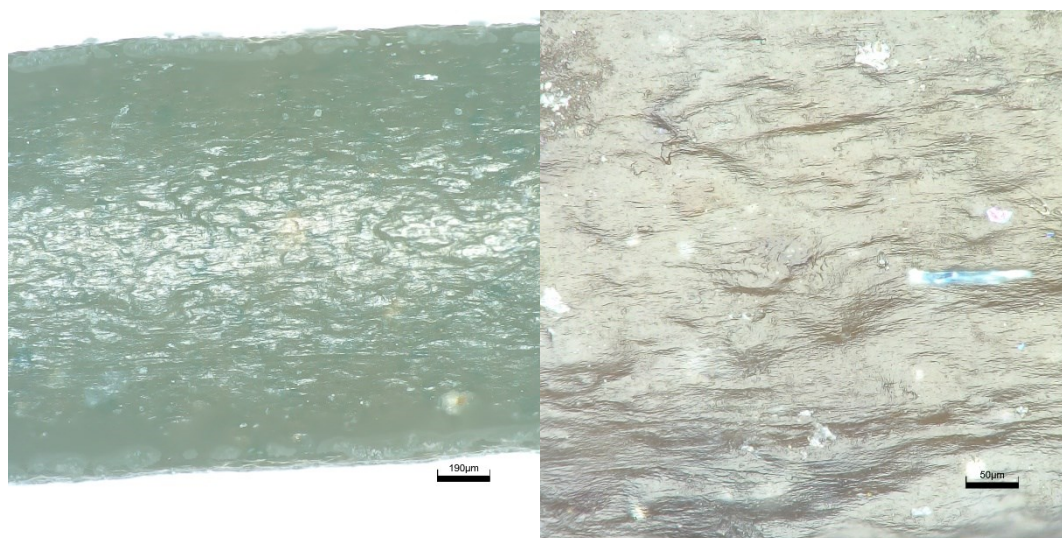
## AFF + 10 % ALG



Obrázek 15: Snímek filamentu ze směsi Affinisolu s 10 % Alginátu sodného, vlevo zvětšení 10x, vpravo zvětšení 40x

Obrázek 15 znázorňuje 3D strukturu affinisolového filamentu s příměsí 10 % alginátu sodného, kdy je v levé části (zvětšení 10x) opět vidět nehomogenita extrudovaného filamentu. V porovnání s Obrázkem 14 (AFF filament) je zde větší množství drobných skvrn tmavší barvy. Tyto tmavší oblasti mohou být způsobeny případnou degradací Affinisolu. Vpravo můžeme opět vidět přiblíženou povrchovou strukturu filamentu. V porovnání s předchozím obrázkem (Obrázek 14) lze konstatovat, že u vlákna s přídavkem alginátu sodného je povrchová struktura více rovnoměrná.

## AFF + 10 % PECC



Obrázek 16: Snímek filamentu ze směsi Affinisolu s pektin citrátem, vlevo zvětšení 10x, vpravo zvětšení 40x

Vlákno s příměsí pektinu z citrusové kůry, které vidíme na Obrázku 16 vypadá na první pohled při zvětšení 10x (vlevo) jednodušji než předchozí vzorky (filament AFF, AFF + 10 % ALG). Skutečná barva filamentu pozorovaná okem (světle hnědá) je zde zobrazena zvoleným nasvícením. Drobné skvrny ve struktuře extrudovaného filamentu je více vidět až při zvětšení 40x (vpravo). Opět je díky 3D zobrazení vidět nerovný povrch filamentu.

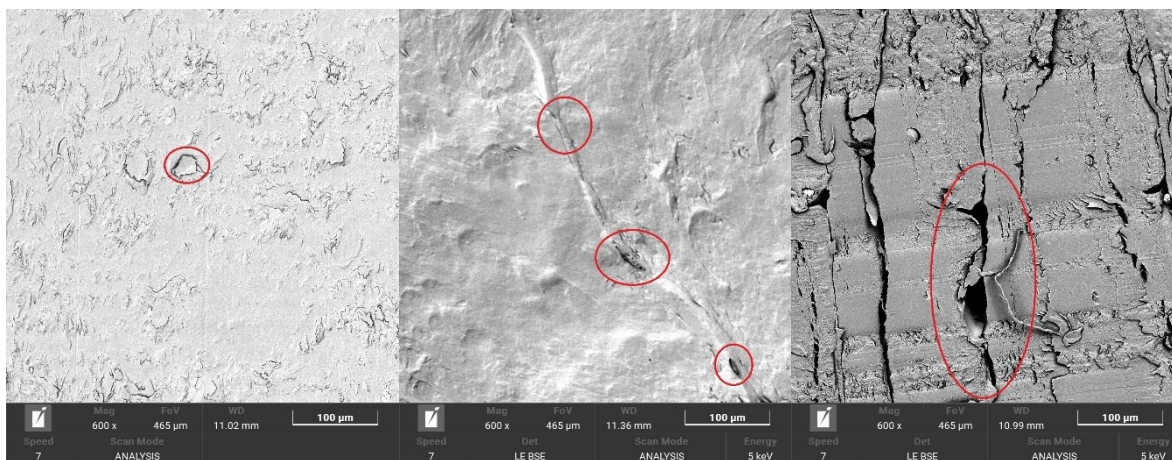
S využitím 3D zobrazení byly u všech vláken pozorovány drobné nerovnosti vnějšího povrchu filamentu. V případě AFF + 10 % ALG vlákna byly tyto nerovnosti ojedinělejší, ale větších rozměrů (lze porovnat díky uvedenému měřítku) naproti tomu u vlákna z AFF a AFF + 10 % PECC se jednalo spíše o kontinuální prostorovou nehomogenitu povrchu. U AFF + 10 % ALG bylo také pozorováno největší množství viditelných tmavých ploch.

### 3.1.3 SEM

V této kapitole jsou snímky pořízené pouze při zvětšení 600x. Mají z hlediska charakterizace podrobné struktury materiálu větší vypovídající hodnotu než panoramatické snímky pořízené při zvětšení 100x. Ty byly použity v rámci rozměrové analýzy, jejíž výsledky shrnují Tabulky 3 – 7 v kapitole 3.1.4. Rozměrová analýza a jsou součástí přílohy práce ve formě CD (obrázky číslo 69 – 106).

#### AFF

Skenovací elektronová mikroskopie poskytla díky lepším možnostem zvětšení vzorků podrobnější informace o detailní struktuře filamentu, i tobolky. Na Obrázku 17 vlevo, kde je detailní struktura AFF filamentu vidíme v červeně zakroužkovaných oblastech nejednotnost ve struktuře. Pravděpodobně se ale jedná o mechanickou nečistotu jelikož ostatní měření pomocí SEM ani optické mikroskopie tento trend neobsahují. Na fotografiích uprostřed a vlevo jsou vidět malé mezery vyskytující se mezi jednotlivými tištěnými vrstvami. V případě podélného řezu tobolkou (vpravo), který souvisí s tiskem vrstev na sebe jsou tyto mezery o něco větší než v případě příčného řezu (uprostřed), který souvisí s tiskem v rámci jedné vrstvy tobolky.



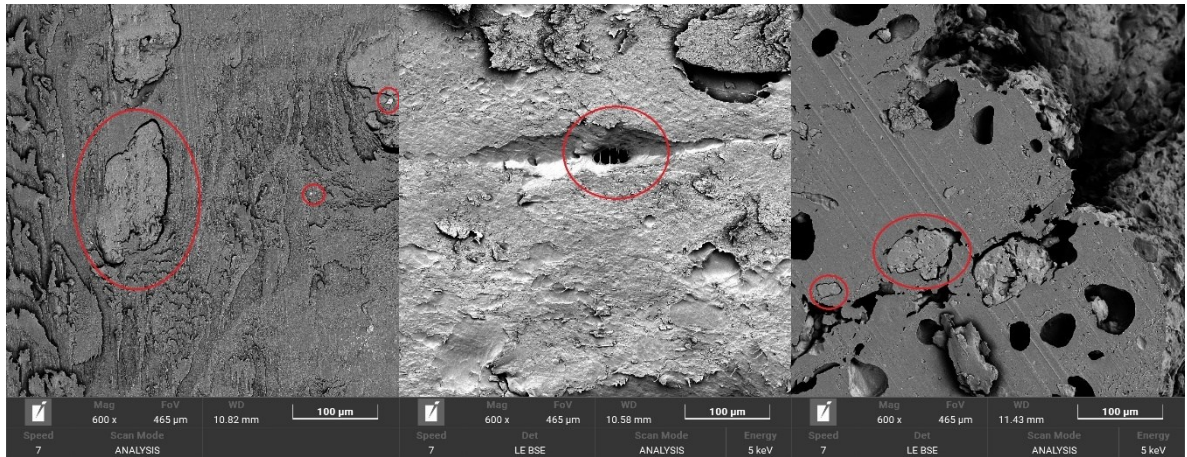
Obrázek 17: Vzorky připravené z *Affinisolu*; Zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou

#### AFF + 10 % ALG

Na Obrázku 18 vlevo a vpravo v červeně zvýrazněných oblastech můžeme vidět póry a fragmenty různých tvarů a velikostí. Póry a fragmenty na Obrázku 18 vpravo mohou být způsobeny nedostatečným přilnutím jednotlivých vrstev při 3D tisku, případně zvýšenou porozitou extrudovaného vlákna. Snímky navíc ukazují, že několikanásobná extruze nemá na zvýrazněné fragmenty vliv. Vyskytují se totiž ve struktuře materiálu jak po první extruzi (vlevo – vzorek filamentu) tak po druhé extruzi (uprostřed a vpravo – vzorek tobolky). Černé díry,



kteřé jsou velmi zřetelné na Obrázku 18 vpravo jsou způsobeny řezem. U čistého AFF vlákna totiž tento aspekt nepozorujeme. Uprostřed Obrázku 18 je ve zvýrazněné oblasti vidět štěrbina vyskytující se mezi tiskem v rámci jedné vrstvy (jednoho patra 3D tisku) tobolky.

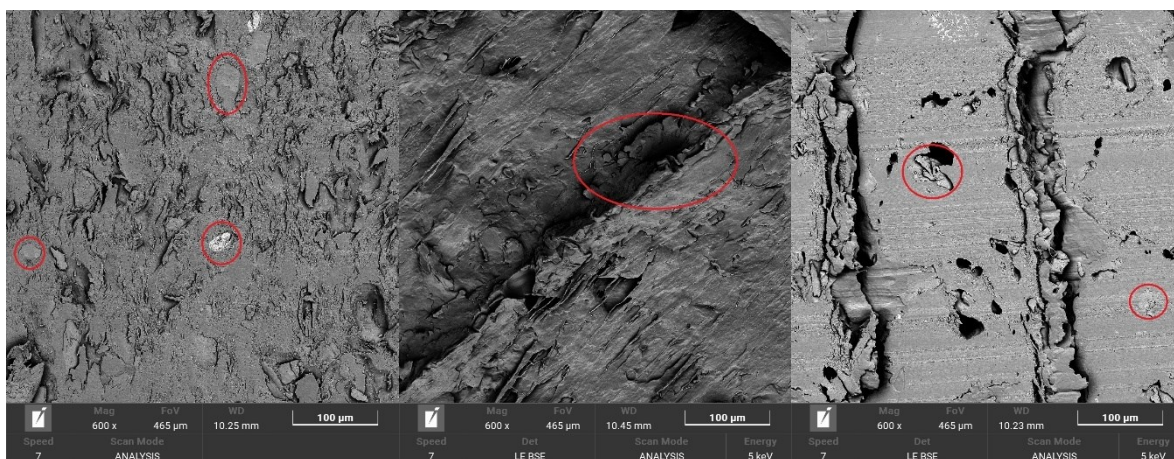


Obrázek 18: Vzorky připravené z Affinisolu s příměsí 10 % alginátu sodného; Zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou

Výše zmíněné fragmenty dokazují příměs alginátu sodného. Na obrázcích pořízených pro vzorky čistého affinisolového materiálu se nevyskytují v žádném z pořízených snímků.

### AFF + 10 % PECC

Třetím testovaným materiálem byly vzorky z AFF s příměsí 10 % pektin citrátu a výsledky jejich měření přibližuje Obrázek 19. Na zmíněném obrázku vlevo jsou vidět drobné útvary nepravidelných rozměrů, které jsou ale hůře viditelné než na předchozích snímcích affinisolových vzorků s příměsí alginátu sodného. Na základě uvedeného měřítka také můžeme konstatovat, že vyskytující se útvary jsou menší než u vzorků AFF + 10 % ALG. Černé díry zřetelné na Obrázku 19 vpravo se mohou stejně jako v předchozím případě vyskytovat vlivem nedostatečným přilnutím jednotlivých vrstev při 3D tisku, případně zvýšenou porozitou extrudovaného vlákna.



Obrázek 19: Vzorky připravené z *Affinisolu* s příměsí 10 % pektin citrátu; Zleva – filament, příčný řez tobolkou, podélný řez tobolkou

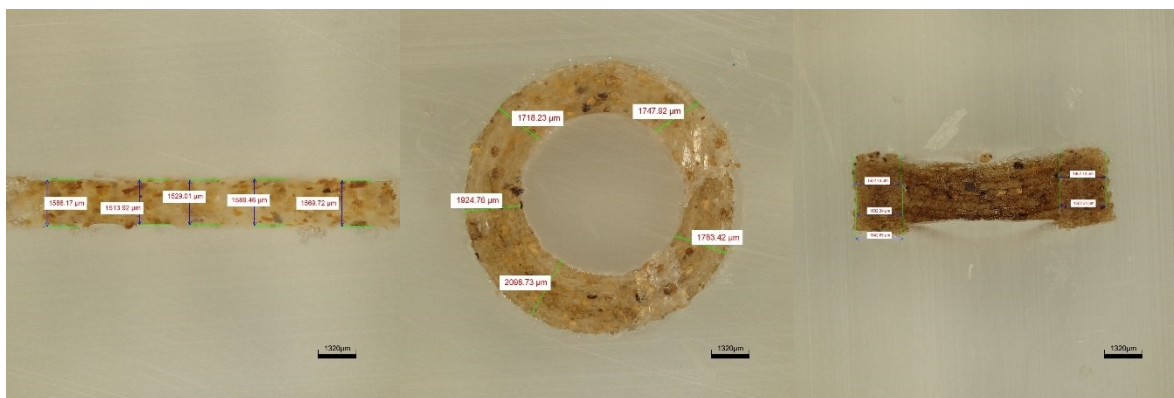
Jedna vrstva tobolky je složena z vláken uspořádaného do soustředných kruhů. Uprostřed Obrázku 19 můžeme pozorovat spojitost vláken jedné vrstvy tobolky. Díky zvětšení, které nám SEM nabídl a odlišným odstínům šedé zde vidíme lehké zaoblení na rozhraní dvou kruhů, které prostupuje do hloubky. Napravo zase vidíme přiléhavost jednotlivých tištěných vrstev na sebe a v červeně zvýrazněných oblastech nekonzistentnost struktury.

Při srovnání testovaných materiálů vykazuje AFF pouze nepatrnou nehomogenitu při tisku jednotlivých vrstev tobolky na sebe, která jsou pozorovatelná především u podélného řezu tobolkou. U AFF + 10 % ALG již pozorujeme různorodou strukturu materiálu v důsledku příměsí alginátu sodného a taktéž u AFF + 10 % PECC je na struktuře vidět příměš pektin citrátu v podobě malých fragmentů. V případě filamentů a tobolek s příměsí alginátu sodného jsou ale fragmenty ve struktuře větší než u vzorků s příměsí pektin citrátu (lze určit na základě přiloženého měřítka) a ani dvojnásobná extruze na ně nemá vliv (jsou pozorovatelné jak na vzorcích filamentu, tak na vzorcích tobolky). Ve spojitosti s těmito fragmenty vznikly také při přípravě vzorků (vlivem řezu) černé díry, které můžeme prostřednictvím SEM vidět.

### 3.1.4 Rozměrová analýza

Snímky pořízené prostřednictvím optického mikroskopu v 2D modu při zvětšení 1x a 10x, v 3D modu při zvětšení 10x a skenovacím elektronovým mikroskopem při zvětšení 100x byly využity k rozměrové analýze jednotlivých vzorků a byly získány hodnoty uvedené v Tabulkách 3-7. V případě 3D optické mikroskopie při zvětšení 40x a SEM při zvětšení 600x nebylo možné vzorek zachytit celý a nemohly tak být získány potřebné hodnoty. Z tohoto důvodu byly snímky s uvedeným zvětšením z rozměrové analýzy vyřazeny.

Pro přehlednost jsou v následujících tabulkách uvedeny pouze průměrné hodnoty a směrodatné odchylky měření. Pro každý rozměr bylo zprůměrováno 10 hodnot. Všechna podrobná data jsou uvedena v rámci přílohy (Příloha 1 – 3). Obrázek 20 a 21 v následující kapitole podrobně znázorňuje rozměry, které byly proměřeny.



Obrázek 20: Přibližení proměřovaných parametrů v rámci rozměrové analýzy na snímcích z OM (AFF + 10 % ALG). Zleva – šířka filamentu, příčný řez tobolkou – tloušťka stěny tobolky, podélný řez tobolkou – tloušťka stěny tobolky

### AFF

Tabulky 3 a 4 shrnují výsledky rozměrové analýzy pro affinisolový filament a tobolku. Výsledky získané proměřováním filamentů 2D optickou a skenovací elektronovou mikroskopií spolu korespondují. V obou případech byly k měření použity totožné vzorky. Drobné variace hodnot mohou být způsobeny jinou tloušťkou vlákna v důsledku extruze materiálu při přípravě filamentů z výchozích surovin. Průměrná tloušťka filamentu naměřená ze snímků 3D optické mikroskopie se liší, protože v tomto případě byl proměřován původní neupravený filament nikoli jeho řez. V případě proměřování vzorků řezů filamentů tedy hodnoty v Tabulce 3 (FIL) značí, že řez válcovým filamentem neprochází přímo jeho středem.

Tabulka 3: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených parametrů vzorků (Obrázek 20) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie

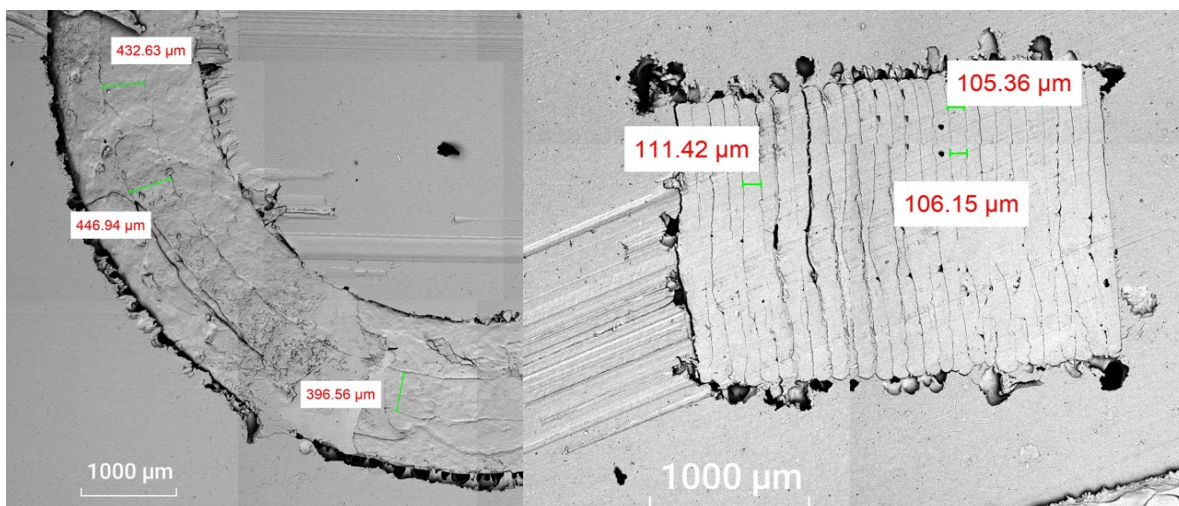
AFF				
Metoda	Označení vzorku	Zvětšení	Průměr (μm)	SMODCH
2D OM	FIL	1x	1641,797	69,289
	FIL	10x	1635,858	18,994
	TOB (příčný řez)	1x	1593,677	48,080
	TOB (příčný řez)	10x	1654,027	14,878
	TOB (podélný řez)	1x	1691,558	79,381
	TOB (podélný řez)	10x	1770,171	67,062
3D OM	FIL (průměr)	10x	1815,532	9,505
SEM	FIL	100x	1504,399	73,975
	TOB (příčný řez)	100x	1532,215	42,208
	TOB (podélný řez)	100x	1664,962	119,590

Snímek jedné vrstvy tobolky, tedy příčný řez tobolkou, nám umožnil naměřit tloušťku jednoho tištěného kruhovitěho útvaru v této vrstvě. Tyto kruhovitě útvary byly sledovány prostřednictvím OM a SEM. Výšku jednotlivých vrstev, které jsou při tisku na sebe nanášeny bylo možné proměřit po provedení podélného řezu tobolkou. Hodnoty v Tabulce 4 dokládají, že naměřené hodnoty ze snímků 2D OM i SEM se shodují a nevykazují velké rozdíly.

Tabulka 4: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených parametrů vzorků (Obrázek 21) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie

AFF				
Metoda	Označení vzorku	Zvětšení	Průměr (μm)	SMODCH
2D OM	TOB (příčný řez)	10x	446,540	17,282
	TOB (podélný řez)	10x	109,458	25,149
SEM	TOB (příčný řez)	100x	439,140	28,767
	TOB (podélný řez)	100x	105,271	4,017

Dále analýza ukázala, že výška jednotlivých vrstev tištěných tobolek z AFF je prakticky čtyřnásobně menší než tloušťka kruhovitěho útvaru v rámci jednoho patra. Zmíněné rozměry znázorňuje Obrázek 21.



Obrázek 21: Vlevo – kruhový útvar jednoho patra; vpravo – výška jednotlivých vrstev

### AFF + 10 % ALG

U testovaných tobolek a filamentů z AFF + 10 % ALG byla naměřená tloušťka filamentu ze snímků 2D OM, 3D OM a SEM velmi podobná a značí tedy pravidelnou strukturu, protože rozměry byly získány z odlišných částí testovaných vzorků a při různých zvětšeních. Na základě množství dat (10 hodnot pro každý rozměr) a faktu, že hodnoty byly proměřovány v odlišných částech filamentu tedy můžeme říct, že struktura AFF + 10 % ALG je pravidelná a variace dat (SMODCH) je v řádu jednotek procent.

Tabulka 5: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených hodnot vzorků (Obrázek 20) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie

AFF + 10 % ALG				
Metoda	Označení vzorku	Zvětšení	Průměr (μm)	SMODCH
2D OM	FIL	1x	1550,835	31,442
	FIL	10x	1507,236	21,354
	TOB (příčný řez)	1x	1924,748	115,620
	TOB (podélný řez)	1x	1644,259	40,631
	TOB (podélný řez)	10x	1712,836	34,843
3D OM	FIL (průměr)	10x	1664,319	28,961
SEM	FIL	100x	1518,914	26,916
	TOB (příčný řez)	100x	1802,127	85,647
	TOB (podélný řez)	100x	1670,815	56,308

U tobolek z AFF + 10 % ALG vykazoval materiál tištěných kruhů v rámci jedné vrstvy kompaktní charakter a nebylo je tedy možné viditelně rozlišit jako u tobolek AFF a AFF + 10 % PECC, a proto zde tabulka těchto rozměrů není uvedena. Dále také nebylo možné při zvětšení

10x proměřit tloušťku stěny tobolky v jejím příčném řezu prostřednictvím 2D OM při z důvodu většího rozměru vlákna (viz. Tabulka 5).

### AFF + 10 % PECC

U posledního testovaného materiálu, jehož naměřené hodnoty jsou v Tabulce 6 a 7, se poměrně lišily hodnoty naměřené pro filament ze snímků 2D OM a SEM oproti snímkům pořízeným 3D OM. Důvodem je opět příprava filamentu, kdy řez nebyl veden přímo jeho středem. Shoda výsledků ze snímků 3D OM všech materiálů (AFF, AFF + 10 % ALG, AFF + 10 % PECC) dokazuje, že filamenty byly extrudovány přes trysku stejného průměru.

U tobolek z AFF + 10 % PECC bylo opět možné proměřit šířku kruhové části jednoho patra (příčný řez) i výšku jedné tištěné vrstvy (podélný řez). I v tomto případě (stejně jako u AFF tobolek) byly pro šířku kruhového útvaru v jedné vrstvě naměřeny vyšší hodnoty než pro výšku jednotlivých pater. Rozdíl byl ale menší než u AFF tobolek.

*Tabulka 6: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených hodnot vzorků (Obrázek 20) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie*

AFF + 10 % PECC				
Metoda	Označení vzorku	Zvětšení	Průměr (μm)	SMODCH
2D OM	FIL	1x	1230,875	103,312
	FIL	10x	1170,542	37,964
	TOB (příčný řez)	1x	1431,732	14,931
	TOB (příčný řez)	10x	1466,199	17,458
	TOB (podélný řez)	1x	1527,087	57,787
	TOB (podélný řez)	10x	1502,445	12,344
3D OM	FIL (průměr)	10x	1557,262	7,838
SEM	FIL	100x	1188,253	75,408
	TOB (příčný řez)	100x	1332,035	29,822
	TOB (podélný řez)	100x	1502,361	24,009

Tabulka 7: Průměrné výsledky a směrodatné odchylky proměřených parametrů vzorků (Obrázek 21) ze snímků optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie

AFF + 10 % PECC				
Metoda	Označení vzorku	Zvětšení	Průměr (μm)	SMODCH
2D OM	TOB (příčný řez)	10x	326,521	43,569
	TOB (podélný řez)	10x	203,600	16,033
SEM	TOB (příčný řez)	100x	319,762	20,946
	TOB (podélný řez)	100x	219,312	16,740

Filamenty byly extrudovány přes trysku stejného průměru. Ze snímků 3D OM bylo zjištěno, že průměry válcovitých filamentů, které byly následně použity k tisku tobolek se liší pouze minimálně. Drobné rozdíly jsou způsobeny odlišnou viskozitou materiálů. Provedená rozměrová analýza vzorků ukázala, že tloušťka stěny tobolky, která byla měřena v jejím příčném i podélném řezu je u AFF + 10 % ALG větší než u tobolek AFF a AFF + 10 % PECC. Z tabulky 4 a 7 je zřejmé, že výška jedné tištěné vrstvy je v obou případech (AFF, AFF + 10 % PEC) menší než tloušťka kruhové části jednoho patra.

Na základě proměřování vzorků v odlišných částech a směrodatných odchylek rozměrů z Tabulek 3 – 7 můžeme říct, že vlákna nevykazují výrazné prostorové odlišnosti. Směrodatné odchylky hodnot příčných řezů tobolkou vykazují ve většině případů nižší hodnoty než řezů podélných. Hodnoty získané z podélných řezů tobolek jsou totiž více ovlivněny viskozitou použitého materiálu a místem, ve kterém tobolku proměřujeme. I přes vyšší SMODCH některých rozměrů např. Tabulka 3 – SEM, zvětšení 100x, TOB (podélný řez) jsou ale vlákna kladena homogenně a při vizuálním pozorování snímků nebyly zjištěny strukturální nedostatky, které by narušovaly kompatibilitu tobolky.

### 3.1.5 IČ spektroskopie

Obrázky 22-24 znázorňují průměr spekter tří měření jednotlivých druhů materiálů. Konkrétně tedy čistého AFF, AFF + 10 % ALG, AFF + 10 % PECC. Můžeme tak porovnat rozdíly vyskytující se v IČ spektru vstupních materiálů před první extruzí (SUR\_AVRG), po první extruzi, kdy je vzorek ve formě filamentu (FIL\_AVRG) a nakonec po druhé extruzi, kdy je vzorek ve formě výsledné tobolky (TOB\_AVRG), které se následně v rámci projektu využívají k disolučnímu testování.

Při vyhodnocování spekter jsem se zaměřila především na změny materiálu způsobené extruzí při přípravě tobolek metodou FDM 3D tisku. Z tohoto důvodu je také následující text zaměřen především na srovnávání a pozorování rozdílů mezi jednotlivými spektry než na konkrétní výčet a charakterizaci jednotlivých absorpčních pásů a jejich vlnočtů.

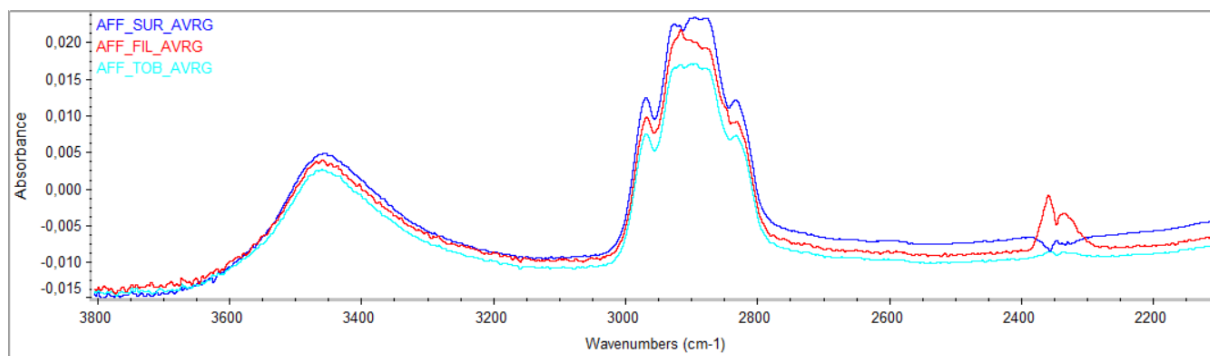
#### **AFF**

Na Obrázku 22 pozorujeme několik výrazných pásů. Díky znalosti výchozího materiálu můžeme pozorovat rozdíly intenzit mezi výchozí surovinou, extrudovaným filamentem a tištěnou tobolkou. V oblasti vlnočtu nad  $3000\text{ cm}^{-1}$  se vyskytuje široký pás OH skupiny Affinisolu. Affinisol je svou chemickou strukturou derivát hydroxypropylmethylcelulózy. Tento pás se po první extruzi (AFF\_FIL\_AVRG) ani po druhé extruzi (AFF\_TOB\_AVRG) výrazně nemění.

V oblasti vlnočtů v rozmezí  $2840 - 2980\text{ cm}^{-1}$ , které lze přiřadit vibracím  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$  skupin se taktéž nevyskytují výrazné změny (v následující kapitole 3.1.6. Ramanova spektroskopie je tento trend totožný). Ze stejných hodnot intenzit spekter pro surovinu, filament i tobolku lze z Obrázků 22 a 23 vyčíst, že v případě vzorků z Affinisolu nedochází ani vlivem extruze k výrazným změnám chemické struktury.

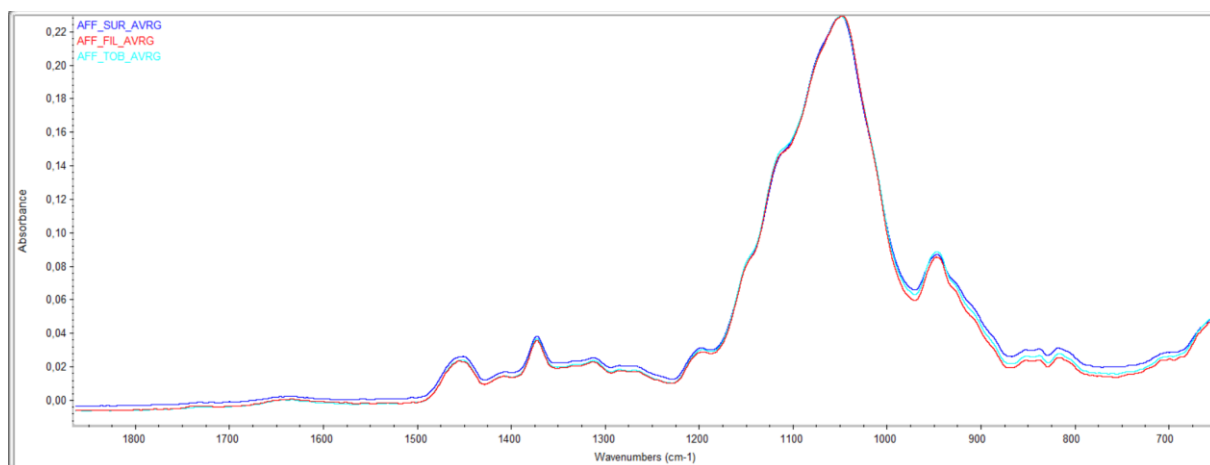
Oblast vlnočtů  $2300 - 2365\text{ cm}^{-1}$  nemá spojitost se strukturou materiálu, ale jedná se příspěvek  $\text{CO}_2$  z okolní atmosféry. Oxid uhličitý se v malé míře vyskytuje taky ve spektrech na Obrázcích 24 a 26 při měření affinisolových vzorků s příměsí alginátu sodného a pektin citrátu.





Obrázek 22: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (AFF\_SUR\_AVRG); po první extruzi – červeně (AFF\_FIL\_AVRG); po druhé extruzi – světle modře (AFF\_TOB\_AVRG)

Dalším důkazem hydroxylové skupiny vyskytující se na substituovaném uhlíku je velmi výrazný absorpční pás v oblasti okolo  $1000 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ , který vidíme na Obrázku 23. Ani tento pás vlivem extruze nemění svou polohu a nedochází tedy ke změně struktury.



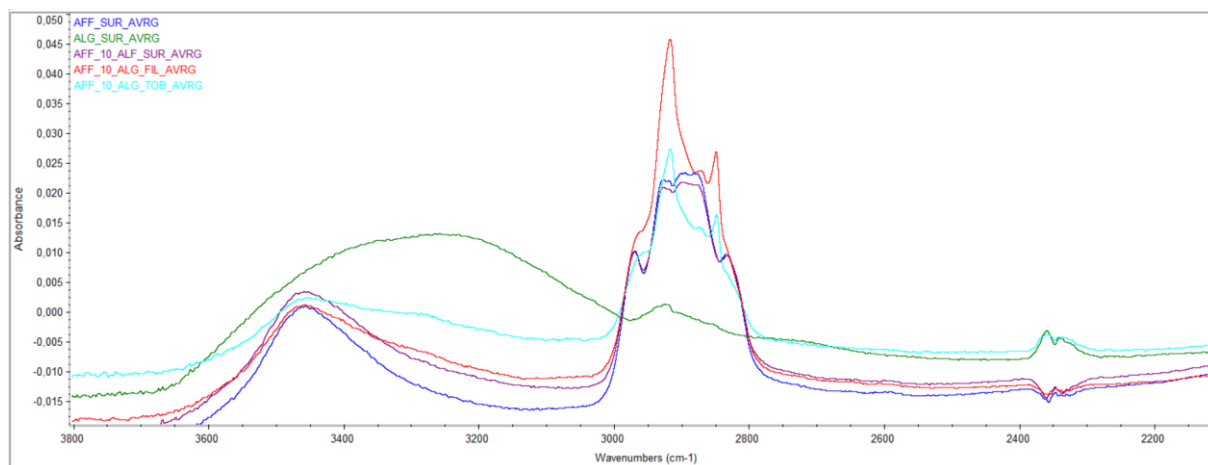
Obrázek 23: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

### AFF + 10 % ALG

Na Obrázku 24 pro směs Affinolu a alginátu sodného pozorujeme pásy v oblasti vlnočtů nad  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , kdy se opět jedná o přítomnost hydroxylových skupin cukerného skeletu molekuly. Široký pás v oblasti  $3250 - 3600 \text{ cm}^{-1}$  charakteristický pro OH skupinu se ani vlivem dvojnásobné extruze nezmění (filament – první extruze, tobolka – druhá extruze).

Změny v IČ spektru tohoto materiálu v souvislosti s extruzí pozorujeme nejvíce v oblasti vlnočtů  $2840 - 2980 \text{ cm}^{-1}$ , kdy se liší tvar spektra i jeho maximum pro filament a výslednou tobolku od spektra směsi výchozích surovin. Vidíme větší maxima píků pro filament a výslednou tobolku.

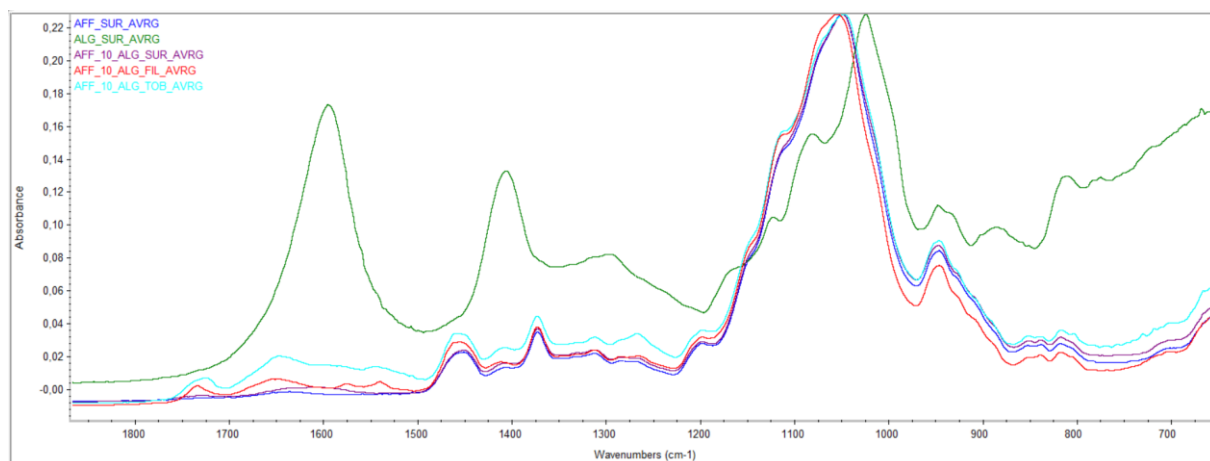
Pásky v oblasti  $2840 - 2980 \text{ cm}^{-1}$  nemění svou polohu pro vzorek suroviny, filamentu a tobolky, ale dochází ke změně tvaru a intenzity. První a druhá extruze tedy nemění chemické vazby typicky se vyskytující pro tyto vlnočty, ale může docházet ke změně vnitřního uspořádání molekuly či vzniku interakcí mezi složkami vlivem vysoké teploty při extruzi.



Obrázek 24: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

Další změny spektra, tentokrát v závislosti na přítomnosti alginátu sodného pozorujeme v oblasti od  $1530 \text{ cm}^{-1}$  do  $1790 \text{ cm}^{-1}$  pozorovatelné na Obrázku 25. Alginát sodný ve své struktuře oproti Affinisolu obsahuje navíc karbonylové skupiny jejichž IČ pásky pozorujeme právě v této oblasti a díky těmto změnám si můžeme potvrdit, že affinisol opravdu obsahuje příměs jiné látky. Přesný vlnočtet karbonylu se liší v závislosti na okolních chemických skupinách.

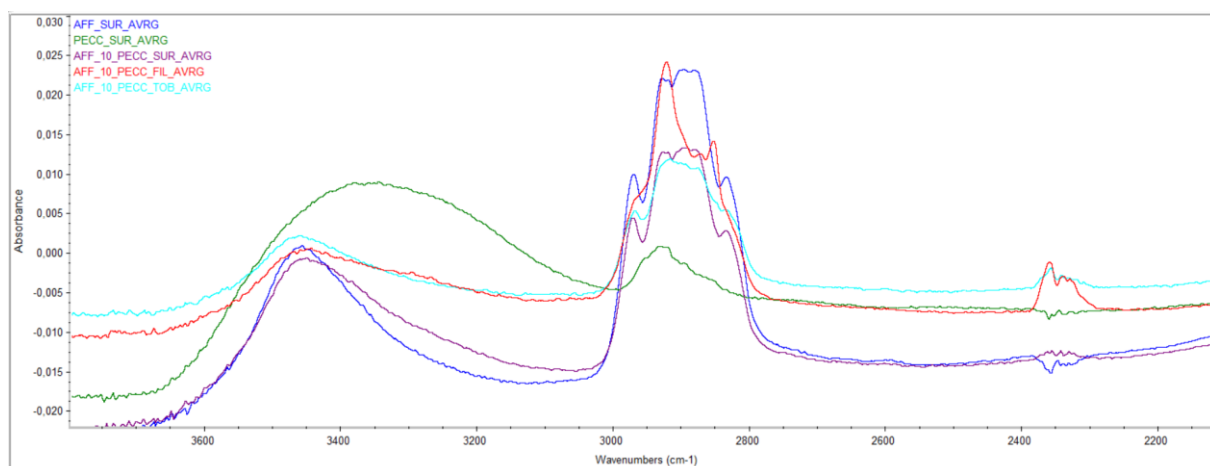
Mimo jiné můžeme v oblasti vlnočtů  $1530 - 1770 \text{ cm}^{-1}$  na Obrázku 25 vidět kolísání intenzit pásky při porovnání původní směsi surovin – nejnižší intenzita (fialová), extrudovaný filament – zvýšení intenzity pásu (červená) a tobolky – nejvyšší intenzita v porovnání se směsí surovin a filamentem (světle modrá). Opět se může jednat o změnu vnitřní struktury v důsledku vysoké teploty při extruzi.



Obrázek 25: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

### AFF + 10 % PECC

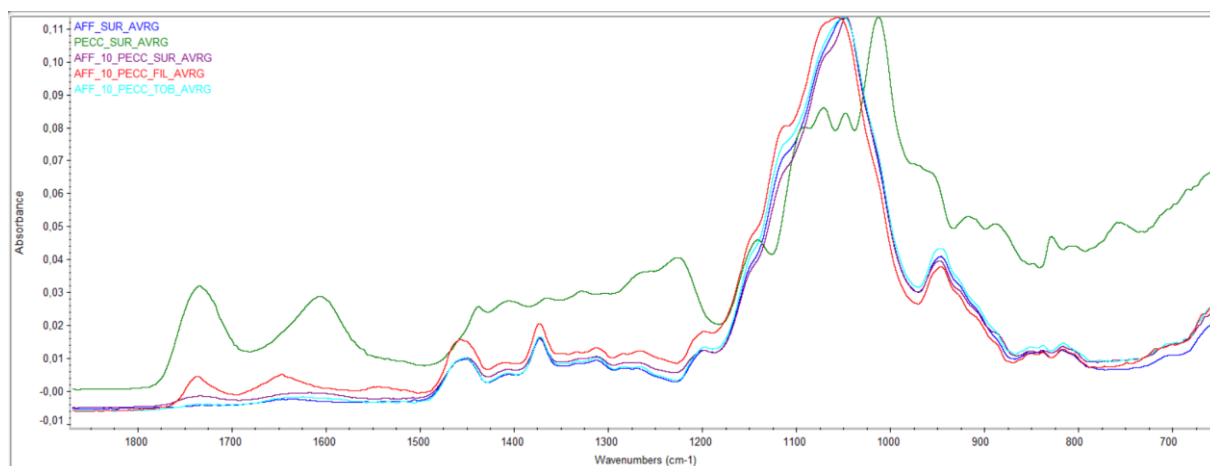
Na Obrázku 26 a 27 jsou znázorněny průměry měření materiálů s příměsí pektin citrátu. V oblasti nad  $3000\text{ cm}^{-1}$  vidíme opět přítomnost hydroxylových skupin pektin citrátu a stejně jako u vzorků s příměsí alginátu sodného nemá extruze na spektrum v této oblasti výrazný vliv. Rozdíly spekter výchozí směsi surovin (fialová), filamentu (červená) a výsledné tobolky (světle modrá) pro tento materiál jsou pozorovatelné v oblasti vlnočtů  $2800 - 2990\text{ cm}^{-1}$ , kdy je maximum píku pro filament (po první extruzi) v této oblasti vyšší v porovnání s maximy píků pro výchozí surovinu a výslednou tobolku. Po první extruzi bude tedy docházet ke změně vnitřního uspořádání molekuly či vzniku interakcí mezi složkami.



Obrázek 26: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

V rozmezí vlnočtů  $1530 - 1790\text{ cm}^{-1}$  můžeme na Obrázku 27 pozorovat přítomnost pektin citrátu. Samotný pektin citrát obsahuje ve své chemické struktuře COOH a COCH<sub>3</sub> skupiny,

kdy jejich rozložení závisí na stupni esterifikace. V tomto případě je ze spektra rozpoznatelná především karbonylová skupina v oblasti vlnočtů 1735 – 1765  $\text{cm}^{-1}$ . Nejvýraznější intenzitu spektra v této oblasti ze všech proměřených vzorků (směs surovin, filament, tobolka) vykazuje vzorek filamentu – po první extruzi (červená) a dochází zde opět vlivem extruze ke změnám vnitřního uspořádání. Pro úplnost je vloženo také naměřené spektrum čistého pektin citrátu.

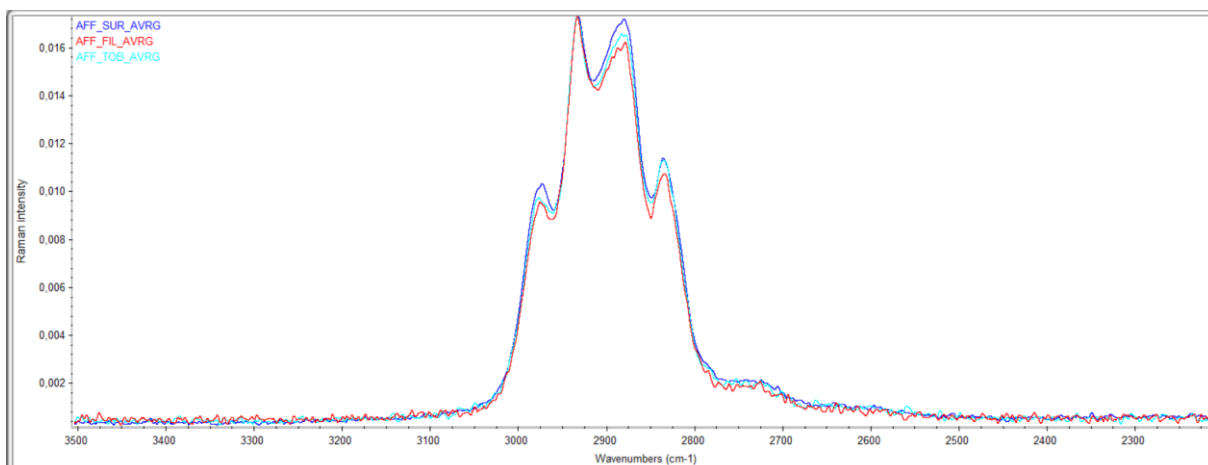


Obrázek 27: Průměry IČ spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC) ; po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

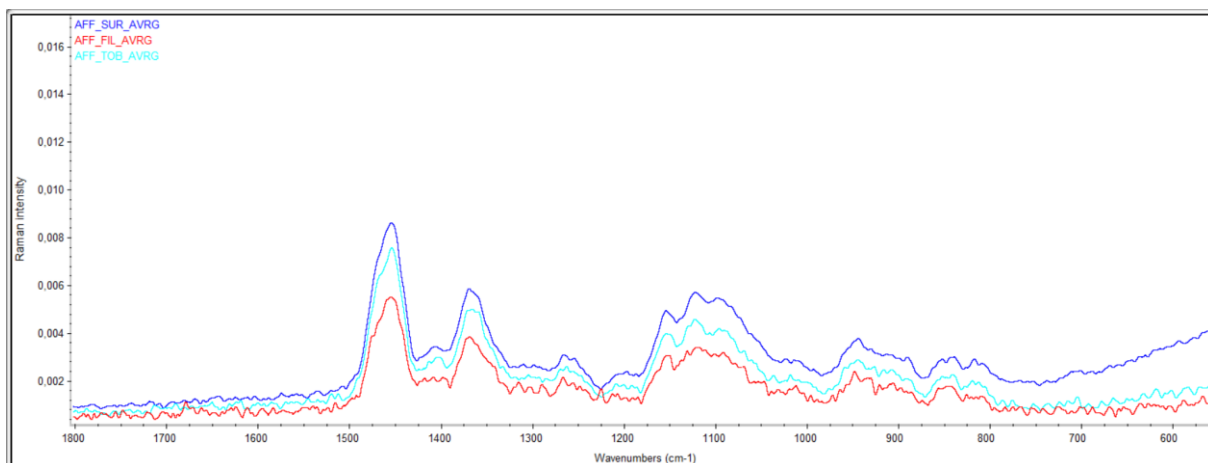
### 3.1.6 Ramanova spektroskopie

#### AFF

Z Ramanových spekter vzorků čistého Affinisolu na Obrázku 28 a 29 vidíme stejně jako u IČ spekter, že extruze nemění polohu pásů a nedochází tak k výrazným změnám chemické struktury či jiným interakcím. Ke změnám vlivem extruze nedochází ani v oblasti nižších vlnočtů v rozmezí 1000 – 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Totožný trend byl pozorován také infračervenou spektroskopií.



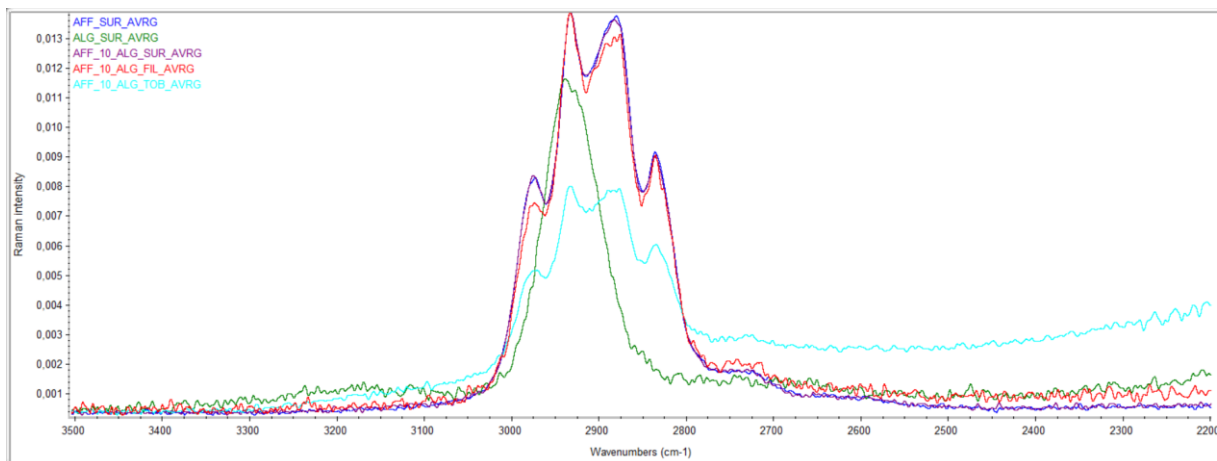
Obrázek 28: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)



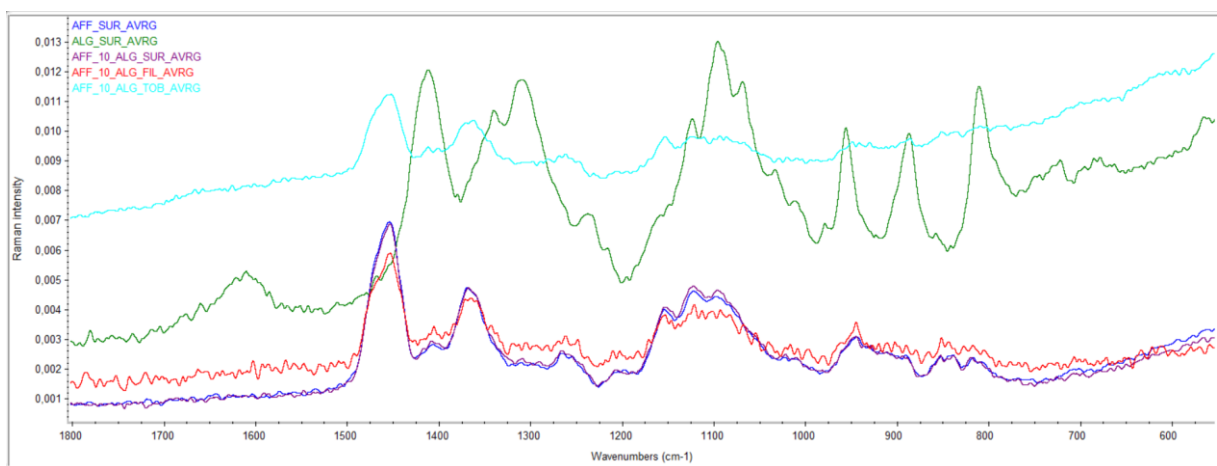
Obrázek 29: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

### AFF + 10 % ALG

Také při měření Ramanových spekter pro Affinisol s příměsí alginátu sodného byly dvě nejzajímavější oblasti pro pozorování v rozmezí 3050 – 2730 cm<sup>-1</sup> a 1650 – 800 cm<sup>-1</sup>. Změna v intenzitě pásu v první zmíněné oblasti (3050 – 2730 cm<sup>-1</sup>) proběhla především u vzorku tobolky. Tento pás vykazuje menší maximum pásů než proměřené vzorky směsi surovin a filamentu. Naproti tomu na Obrázku 31 je zřejmé, že spektrum naměřené pro vzorek tobolky v oblasti 1650 – 800 cm<sup>-1</sup> vykazuje vyšší intenzitu zatím co spektrum vzorku filamentu prakticky kopíruje linii spektra naměřeného pro výchozí směs surovin. Ze spektra je taky zřetelná poměrně vysoká fluorescence měřených látek.



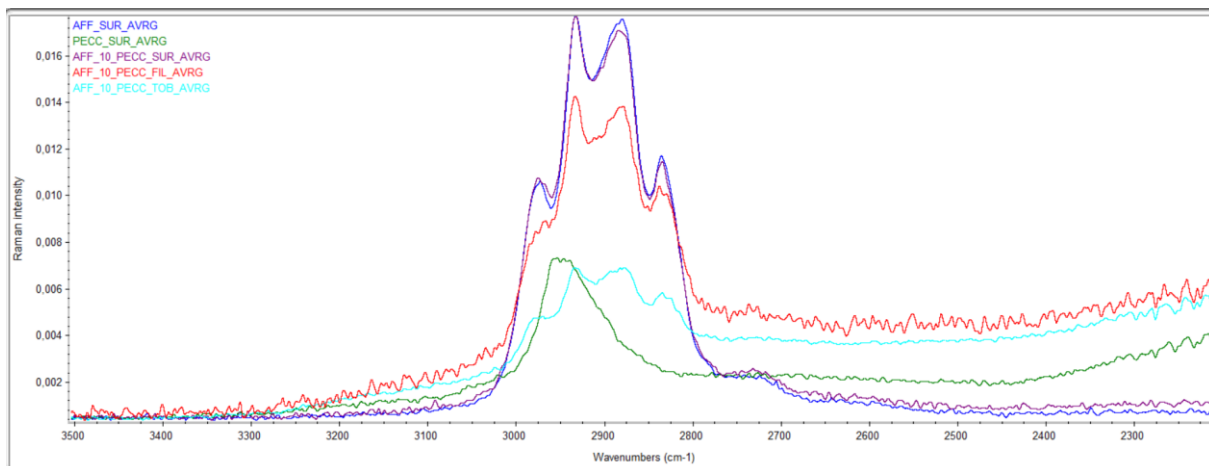
Obrázek 30: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)



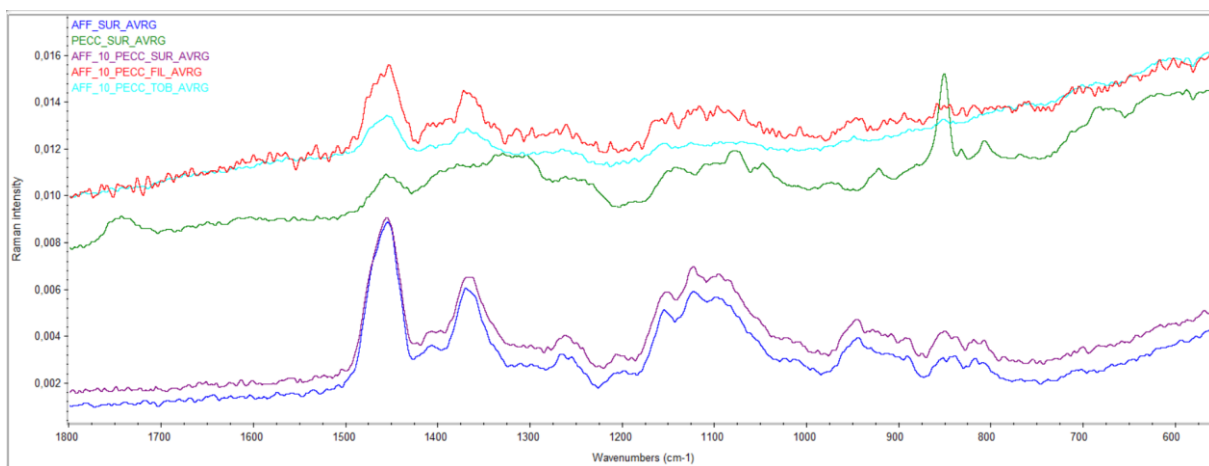
Obrázek 31: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (alginát sodný), fialově (AFF + 10 % ALG); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

### AFF + 10 % PECC

Změny vnitřního uspořádání molekul a vliv vysoké teploty extruze byly pozorovány také pro směs Affinisolu s pektin citrátem a výsledky měření ukazují Obrázky 32 a 33. Změny intenzit pro měřené vzorky byly stejně jako u vzorků AFF + 10 % ALG pozorovány v oblasti 3050 – 2700  $\text{cm}^{-1}$ , kdy byla opět naměřena nejnižší intenzita pro vzorek tobolky. Při měření vzorků s příměsí pektin citrátu je velmi zřetelná fluorescence především v oblasti nižších vlnočtů (1550 – 800  $\text{cm}^{-1}$ ) kdy jsou maxima píků hůře rozeznatelná. V této oblasti se také lišila intenzita a průběh spektra pro vzorek filamentu a tobolky oproti naměřenému spektru směsi výchozích látek.



Obrázek 32: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)



Obrázek 33: Průměry Ramanových spekter: před extruzí – tmavě modře (Affinisol), zeleně (pektin citrát), fialově (AFF + 10 % PECC); po první extruzi – červeně (filament); po druhé extruzi – světle modře (tobolka)

## 4 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je součástí projektu vývoje enterosolventních tobolek připravovaných metodou FDM 3D tisku. Práce se zabývá především charakterizací fyzikálních a chemických vlastností extrudovaných filamentů následně použitých k přípravě tobolek i tobolek samotných.

Nejprve byla studována vnější struktura filamentů prostřednictvím 3D optické mikroskopie a provedena rozměrová analýza jednotlivých vláken. Na základě rozměrové analýzy v kombinaci s pořízenými snímky bylo zjištěno, že drobné nerovnosti vnějšího povrchu AFF + 10 % ALG filamentu byly ojedinělejší, ale větších rozměrů. Naopak u vzorků AFF a AFF + 10 % PECC se jednalo spíše o kontinuální disproporce povrchu způsobené procesem tisku. Tabulka 8 shrnující výsledky rozměrové analýzy filamentů ale dokazuje, že jsou malé nerovnosti povrchu prakticky zanedbatelné. Proměřené rozměry vláken jejichž výsledky jsou shrnuty v Tabulce 8 ukazují skutečnost, že přesto, že byly filameny extrudovány přes trysku stejného průměru je možné extrudovat vlákna jejichž průměr se minimálně liší. Různé průměry vláken jsou ovlivněny viskozitou materiálu. Ze snímků 3D OM byly ve filamentech AFF + 10 % ALG a AFF + 10 % PECC zpozorovány malé tmavé plochy materiálu způsobené pravděpodobně degradací vstupních surovin v důsledku vysoké teploty při extruzi.

Tabulka 8: Shrnutí výsledků pro průměr filamentů

3D OM - FIL			
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)	SMODCH
AFF FIL	10x	1815,532	9,505
AFF 10 ALG FIL	10x	1664,319	28,961
AFF 10 PECC FIL	10x	1557,262	7,838

Existuje několik faktorů, které ovlivňují tloušťku stěny tobolky. V Tabulce 9 vidíme, že přesto, že tobolky ze všech materiálů byly tištěny přes trysku stejného průměru, je možné získat tobolky lišící se tloušťkou stěny. Tabulka 9 představuje souhrn všech naměřených hodnot pro tento parametr (2D OM – příčný i podélný řez tobolkou zvětšení 1x a 10x, SEM – příčný i podélný řez tobolkou zvětšení 100x). Tloušťka stěny tobolky je ovlivněna jak viskozitou materiálu, tak samotným nastavením tiskárny a kalibrací osy z. Díky tomu jsme schopni modifikovat výsledné tobolky nejenom volbou použitých materiálů, ale také při procesu tisku a nabízí se nám tak možnost rychlé úpravy podmínek.



Tabulka 9: Souhrn všech výsledků naměřených v rámci rozměrové analýzy pro tloušťku stěny tobolk

Tloušťka stěny tobolky		
Označení vzorku	Rozměr ( $\mu\text{m}$ )	SMODCH
AFF	1651,102	69,124
AFF + 10 % ALG	1750,957	93,168
AFF + 10 % PECC	1460,310	60,129

SEM nám nabídla pohled na mikrostrukturu testovaných vzorků a umožnila pozorování homogenity vzorků v závislosti na dvojnásobné extruzi (první extruze – filament, druhá extruze – tobolka). Pro AFF tobolky byly zpozorovány pouze nepatrné diskontinuity v oblasti tisku jednotlivých vrstev na sebe. Pro AFF + 10 % ALG a AFF + 10 % PECC byla na snímcích zřetelně vidět různorodá struktura materiálu v důsledku příměsi alginátu sodného a pektin citrátu v podobě malých fragmentů. Dvojnásobná extruze na tyto fragmenty neměla vliv, jelikož se vyskytovaly jak na snímcích filamentů (po první extruzi) tak na snímcích tobolek (po druhé extruzi). Póry a fragmenty mohou být způsobeny nedostatečným přilnutím částí jednotlivých vrstev při 3D tisku, případně zvýšenou porozitou extrudovaného vlákna. Mezi tištěnými vrstvami ale nebyly zjištěny výrazné ruptury, které by mohly potenciálně negativním způsobem ovlivnit následné disoluční testování tobolek nebo uvolňování účinné látky.

Celý experiment byl doplněn měřením spekter infračervené a Ramanovy spektroskopie. Spektra infračervené spektroskopie potvrdily přítomnost daných vstupních surovin v extrudovaných filamentech i tištěných tobolkách a změny průběhu pásů i intenzit ve vybraných oblastech potvrdily vliv vysoké teploty extruze na vnitřní chemické uspořádání molekul. Vzhledem k poměrně vysoké fluorescenci výchozích surovin použitých k extruzi filamentů a tisku tobolek měly spektra infračervené spektroskopie větší vypovídající hodnotu než Ramanova spektra.

## SEZNAM LITERATURY

1. MIKLOVÁ, Monika. Využití FDM 3D tisku při přípravě pevných lékových forem. Bakalářská práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2022.
2. BRAMBILLA, Chiara R. M.; OKAFOR-MUO, Ogochukwu Lilian; HASSANIN, Hany a ELSHAER, Amr. 3DP Printing of Oral Solid Formulations: A Systematic Review. *Pharmaceutics*. 2021, roč. 13, č. 358, s. 25.
3. MANIRUZZAMAN, Mohammed a NOKHODCHI, Ali. Development and Optimisation of Novel Polymeric Compositions for Sustained Release Theophylline Caplets (PrintCap) via FDM 3D Printing. *Polymers*. 2020, roč. 12 (1), č. 27, s. 1-18.
4. HENRY, S.; SAMARO, A.; MARCHESINI, F.H.; SHAQOUR, B.; MACEDO, J. et al. Extrusion-based 3D printing of oral solid dosage forms: Material requirements and equipment dependencies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021, roč. 598, č. 120361, s. 1-13.
5. ZHENG, Yu; DENG, Feihuang; WANG, Bo; WU, Yue; LUO, Qing et al. Melt extrusion deposition (MED™) 3D printing technology – A paradigm shift in design and development of modified release drug products. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021, roč. 602, č. 120693, s. 1-14.
6. *Labiotech* [online]. Německo: Labiotech UG, 2022 [cit. 2023-08-03]. Dostupné z: <https://www.labiotech.eu/best-biotech/five-companies-personalizing-treatments-with-3d-printed-drugs/>
7. FabRx. Online. 2023, 2023. Dostupné z: <https://www.fabrx.co.uk/about>. [cit. 2023-10-04].
8. INNOVATIONS IN 3D PRINTED PHARMACEUTICALS [online]. United Kingdom, Lewes: Frederick Furness Publishing, 2020 [cit. 2023-08-08]. Dostupné z: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.ondrugdelivery.com/wp-content/uploads/2020/07/109\\_Jul\\_2020\\_FabRx.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.ondrugdelivery.com/wp-content/uploads/2020/07/109_Jul_2020_FabRx.pdf)
9. FERNÁNDEZ-GARDA, Raquel; PRADA, María; BOLÁS-FERNÁNDEZ, Francisco a SERRANO, Dolores R. Oral Fixed-Dose Combination Pharmaceutical Products: Industrial Manufacturing Versus Personalized 3D Printing. *Pharmaceutical research*. 2020, roč. 2020, č. 37, s. 1-22.
10. ELBADAWI, Moe, Abdul W. BASIT a Simon GAISFORD. Energy consumption and carbon footprint of 3D printing in pharmaceutical manufacture. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, 639 (122926), 8.

11. Novorozenečný screening: Leucinóza (MSUD) [online]. Česká Republika: Kolektiv autorů, 2023 [cit. 2023-08-03]. Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz/leucinoza-msud>
12. Toit, Lisa C. Du Kumar, Pradeep Choonara, Yahya E. Pillay, Viness. (2020). Advanced 3D-Printed Systems and Nanosystems for Drug Delivery and Tissue Engineering - 2.5 Existing 3D-Printed Solid Oral Dosage Forms. Elsevier [cit. 2023-09-28]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt012LM4F3/advanced-3d-printed-systems/existing-3d-printed-solid>.
13. GOYANES, Alvaro; MADLA, Christine M.; UMERJI, Aysha; PINEIRO, Goretti Duran; MONTERO, Jose Maria Giraldez et al. Automated therapy preparation of isoleucine formulations using 3D printing for the treatment of MSUD: First single-centre, prospective, crossover study in patients. International Journal of Pharmaceutics. 2019, roč. 567, č. 118497, s. 8.
14. Chemie léčiv [online]. Masarykova univerzita [cit. 2023-09-28]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/C8790/um/31610507/Farm06.pdf>
15. Mehta, S. C. Kar, Ashutosh. (2014). Pharmaceutical Pharmacology - 19.3.1 Reason for Irrational Use of Drugs [online]. New Academic Science [cit. 2023-09-28]. ISBN 978-1-781830-68-0. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011NOV0L/pharmaceutical-pharmacology/reason-irrational-use>
16. HAMPL, František; RÁDL, Stanislav a PLAČEK, Jaroslav. Farmakochemie. 3. upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-875-7.
17. SENEER. What's the difference between soft and hard Gelatin capsules? Online. 2022, 2023. Dostupné z: <https://www.senieer.com/whats-the-difference-between-soft-and-hard-gelatin-capsules/>. [cit. 2023-10-06].
18. CAPSULCN. 5 Different Types of Capsules - Pill Capsules Shell Guide. Online. 2019. Dostupné z: <https://www.capsulcn.com/different-types-of-capsules-guide>. [cit. 2023-10-06].
19. Kalmer RR, Haddadan MM, Azizi M, Ghanbari M, Samandarian D, Sadjadinia A, Ramezanalizadeh H, Karimi A, Golizadeh M. Industrial Manufacture of Enteric Hard Capsules Using Novel Formulations Based on Hypromellose Phthalate/Gelatin and Investigation of Pantoprazole Release. ACS Omega. 2023 Mar 17;8(12):11293-11303.

- doi: 10.1021/acsomega.2c08290. PMID: 37008088; PMCID: PMC10061655. [cit. 2023-10-08].
20. RABIŠKOVÁ, Miloslava a Vítězslava FRIČOVÁ. Perorální formy s řízeným uvolňováním léčiv. *Solen*. 2008, 4(4), 186-190.
  21. TRENFIELD, Sarah a BASIT, Abdul W. Modified drug release: Current strategies and novel technologies for oral drug delivery. In: *Nanotechnology for Oral Drug Delivery*. 1. Academic Press, 2020, s. 177-197. ISBN 978-0-12-818038-9.
  22. Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph. B. MMXVII). 1.-4. díl, Evropská část, Národní část. Praha: Grada Publishing, 2017. s. 4904. ISBN 978-80-271-0500-7.
  23. HONG, Wen a PARK, Kinam. Introduction and Overview of Oral Controlled Release Formulation Design. In: *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*. 1. John Wiley, 2010, s. 1-19. ISBN 9780470253175.
  24. Koziol M, Grimm M, Becker D, Jordanov V, Zou H, Shimizu J, Wanke C, Garbacz G, Weitschies W. Investigation of pH and Temperature Profiles in the GI Tract of Fasted Human Subjects Using the Intellicap(®) System. *J Pharm Sci*. 2015 Sep;104(9):2855-63. doi: 10.1002/jps.24274. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25411065.
  25. VINAROV, Zahari; ABDALLAH, Mohammad; AGUNDEZ, José A.G.; ALLERGAERT, Karel; BASIT, Abdul W. et al. Impact of gastrointestinal tract variability on oral drug absorption and pharmacokinetics: An UNGAP review.
  26. DVOŘÁČKOVÁ, Kateřina; FRANC, Aleš a KEJDUŠOVÁ, Martina. SMĚROVÁNÍ LÉČIV DO TLUSTÉHO STŘEVA. *Chemické listy*. 2013, roč. 107, č. 7, s. 522-529.
  27. VAŠÍŘOVÁ, Mgr. Zuzana. Faktory ovlivňující biologickou dostupnost léčiv. Online. *Remedia*. 2017, roč. 2017, č. 4. Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/klinicka-farmakologie-a-farmacie/faktory-ovlivnujici-biologickou-dostupnost-leciv-9022/>. [cit. 2023-11-02].
  28. INFEKTOLOGIE.CZ. Doporučený postup fekální bakterioterapie pro léčbu rekurentní klostridiové kolitidy. Online. 2018. Dostupné z: <https://infektologie.cz/DPFMT18.htm>. [cit. 2023-09-28].
  29. RAO, Krishna a YOUNG, Vincent B. Fecal Microbiota Transplantation for the Management of Clostridium difficile Infection. Online. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2015, roč. 29, č. 1, s. 109. Dostupné z: <https://doi.org/DOI10.1016/j.idc.2014.11.009>. [cit. 2023-09-28].

30. SUBRAMANIAN, K.S., G.J. JANAVI, S. MARIMUTHU, M. KANNAN, K. RAJA, S. HARIPRIYA, D. Jeya Sundara SHARMILA a Pon. Sathya MOORTHY. Textbook on Fundamentals and Applications of Nanotechnology. 1. Daya Publishing House, 2018. ISBN 9351249328.
31. CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY. Optical Microscopy. Online. Dostupné z: <https://engineering.case.edu/research/centers/swagelok-surface-analysis-materials/image-analysis/optical-microscopy%20>. [cit. 2023-11-08].
32. EVIDENT. Digitální mikroskopy řady DSX1000 – model nejvyšší úrovně. Online. 2019. Dostupné z: <https://www.olympus-ims.com/cs/microscope/dsx1000/high-end-model/>. [cit. 2023-11-09].
33. DEON, Monique; SANTOS, Juliana dos; ANDRADE, Diego Fontana de a RUIVER BECK, Ruy Carlos. A critical review of traditional and advanced characterisation tools to drive formulators towards the rational development of 3D printed oral dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022, roč. 628, č. 122293, s. 1-22.
34. ASADI, Maryam; SALEHI, Zeinab; AKRAMI, Mohammad; HOSSEINPOUR, Mohammadreza; JOCKENHOVEL, Stefan et al. 3D printed pH-responsive tablets containing N-acetylglucosamine-loaded methylcellulose hydrogel for colon drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, roč. 645, č. 123366, s. 1-15.
35. PICCO, Camila J.; UTOMO, Emilia; MCCLEAN, Andrea; DOMÍNGUEZ-ROBLES, Juan; ANJANI, Qonita Kurnia et al. Development of 3D-printed subcutaneous implants using concentrated polymer/drug solutions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023, roč. 631, č. 122477, s. 1-11.
36. KANIA, Patrik. Infračervená spektroskopie. Online. 1. VŠCHT Praha, 2006. Dostupné z: <https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/0007~~M9f1dAYA.pdf>. [cit. 2023-11-13].
37. EWING, Andrew V. a KAZARIAN, Sergei G. Recent advances in the applications of vibrational spectroscopic imaging and mapping to pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018, roč. 197, č. 2018, s. 10-29.
38. K. Vytrás a kol. Laboratorní cvičení z instrumentální analýzy. Skripta, Univerzita Pardubice, 2005.
39. WRAY, Patrick S.; CLARKE, Graham S. a KAZARIAN, Sergei G. Application of FTIR Spectroscopic Imaging to Study the Effects of Modifying the pH

Microenvironment on the Dissolution of Ibuprofen from HPMC Matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, roč. 100, č. 11, s. 4745-4755.

40. Alginát sodný pro biochemii; CAS RN: 9005-38-3; 9180; 2.0 cs; Carl Roth; Německo; 2022-07-25. <https://www.carlroth.com/medias/SDB-9180-CZCS.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyMjk3NzV8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oOTUvaDQxLzkwODI0ODUxNDU2MzAucGRmfDU5OWIyODNiMTc1YmU5YzE2MDE1NDg0N2Y1ZWVmNzg5MjgxNGVhZWl4ODNkNTliMGQ5N2EzNmE3MGQ5YmEzMWY>
41. SVOBODA, Roman; NEVYHOŠTĚNÁ, Marie; MACHÁČKOVÁ, Jana; VACULÍK, Jan; KNOTKOVÁ, Kateřina et al. Thermal degradation of Afnisol HPMC: Optimum Processing Temperatures for Hot Melt Extrusion and 3D Printing. *Pharmaceutical Research*. 2023, roč. 40, s. 2253–2268.

# PŘÍLOHY

Příloha 1: Naměřená data rozměrové analýzy pro materiál AFF

AFF					
2D OM					
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)	Zvětšení	Rozměr (μm)	Rozměr (μm)
AFF FIL 1A	1x	1716,25	10x	1622,36	
		1710		1622,34	
		1680		1640,31	
		1716		1637,29	
		1730		1652,22	
AFF FIL 1B	1x	1557,8	10x	1593,28	
		1544,02		1625,68	
		1617,74		1644,01	
		1597,89		1653,06	
		1548,27		1668,03	
AFF TOB 1A	1x	1613,97	10x	1632,09	462,22
		1634,67		1661,33	471,3
		1649,2		1653,97	463,09
		1610,1		1641,17	458,17
		1688,18		1632,35	463,01
AFF TOB 1B	1x	1561,82	10x	1639,22	420,85
		1560,02		1672,06	426,63
		1549,04		1668,54	423,36
		1534,85		1667,1	441,49
		1534,92		1672,44	435,28
AFF TOB 2A	1x	1562,12	10x	1724,45	96,1
		1573,28		1691,24	105,61
		1762,96		1683,08	92,05
		1785,28		1701,63	92
		1606,75		1712,36	98,26
AFF TOB 2B	1x	1696,3	10x	1826,5	96,68
		1715,73		1845,87	106,63
		1685,63		1854,33	181,47
		1755,86		1798,66	115,85
		1771,67		1863,59	109,93

AFF			
SEM			
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)	Rozměr (μm)
AFF FIL 1A	100x	1490,54	
		1459,01	
		1527,96	
		1369,94	
		1381,47	
AFF FIL 1B	100x	1526,45	
		1544,59	
		1535,92	
		1579,16	
		1628,95	
AFF_TOB_1A	100x	1513,58	460,93
		1530,18	491,17
		1523,98	446,94
		1556,31	396,56
		1576,36	432,63
AFF_TOB_1B	100x	1454,2	378,45
		1626,89	450,71
		1531,77	438,12
		1499,19	443,97
		1509,69	451,92
AFF_TOB_2A	100x	1795,34	111,42
		1840,75	105,36
		1852,19	106,15
		1477,71	98,06
		1519,53	106,95
AFF_TOB_2B	100x	1651,29	96,78
		1705,72	107,27
		1563,03	106,99
		1588,66	106,82
		1655,4	106,91



AFF		
3D OM		
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)
AFF FIL 1A	10x	1840,17
		1814,52
		1822,78
		1817,63
		1808,07
AFF FIL 1B	10x	1817,28
		1813,53
		1802,25
		1806,54
		1812,55

Příloha 2: Naměřená data rozměrové analýzy pro materiál AFF + 10 % ALG

AFF + 10 % ALG				
2D OM				
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)	Zvětšení	Rozměr (μm)
AFF ALG FIL 1A	1x	1589,46	10x	1498,22
		1586,17		1479,09
		1569,72		1468,98
		1529,01		1500,61
		1513,92		1494,99
AFF ALG FIL 1B	1x	1583,49	10x	1531,87
		1566,67		1533,65
		1562,66		1540,48
		1507,1		1515,79
		1500,15		1508,68
AFF ALG TOB 1A	1x	2095,9		
		1806,03		
		1985,12		
		1727,06		
		1731,4		
AFF ALG TOB 1B	1x	1975,65		
		1993,97		
		2048,45		
		1930,23		
		1953,67		
AFF ALG TOB 2A	1x	1625,54	10x	1647,59
		1681,12		1701,52
		1701,96		1728,48
		1715,85		1737,46

		1625,54		1737,46
AFF ALG TOB 2B	1x	1640,52	10x	1646,9
		1590,51		1712,77
		1630,52		1715,77
		1640,52		1736,73
		1590,51		1763,68

AFF + 10 % ALG		
SEM		
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (µm)
AFF ALG FIL 1A	100x	1531,27
		1492,72
		1506,19
		1562,65
		1480,03
AFF ALG FIL 1B	100x	1532,85
		1542,71
		1509,1
		1507,88
		1523,74
AFF ALG TOB 1A	100x	1833,73
		1827,86
		1807,23
		1937,5
		1818,81
AFF ALG TOB 1B	100x	1861,41
		1824,77
		1616,31
		1835,5
		1658,15
AFF ALG TOB 2A	100x	1578,2
		1649,73
		1667,62
		1695,45
		1636,44
AFF ALG TOB 2B	100x	1675,06
		1698,82
		1808,19
		1690,9
		1607,74

AFF + 10 % ALG		
3D OM		
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)
AFF ALG FIL A	10x	1639,92
		1640,11
		1660,81
		1693,11
		1741,55
AFF ALG FIL B	10x	1675,01
		1655,15
		1648,73
		1645,86
		1642,94

Příloha 3: Naměřená data rozměrové analýzy pro materiál AFF + 10 % PECC

AFF + 10 % PECC					
2D OM					
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)	Zvětšení	Rozměr (μm)	Rozměr (μm)
AFF PECC FIL 1A	1x	1292,19	10x	1213,28	
		1267,10		1210,38	
		1275,43		1208,67	
		1242,09		1193,66	
		1225,42		1219,07	
AFF PECC FIL 1B	1x	1324,84	10x	1122,32	
		1016,22		1152,46	
		1354,71		1138,46	
		1274,86		1122,74	
		1035,89		1124,38	
AFF PECC TOB 1A	1x	1433,66	10x	1431,11	366,63
		1426,66		1469,60	333,48
		1409,85		1495,85	394,05
		1460,31		1458,33	289,02
		1428,18		1452,94	395,49
AFF PECC TOB 1B	1x	1419,85	10x	1465,85	241,20
		1476,23		1496,70	304,64
		1409,21		1458,34	318,16
		1448,42		1466,19	321,43
		1431,15		1467,08	301,11
AFF PECC TOB 2A	1x	1463,91	10x	1483,27	214,31
		1480,45		1510,07	186,79
		1472,18		1513,85	228,56

		1480,45		1509,53	200,65
		1463,91		1494,14	184,95
AFF PECC TOB 2B	1x	1594,02	10x	1491,86	202,35
		1573,97		1482,41	189,99
		1523,85		1522,72	208,43
		1584,00		1510,29	234,06
		1634,13		1506,31	185,91

AFF + 10 % PECC			
SEM			
Označení vzorku	Zvětšení	Rozměr (μm)	Rozměr (μm)
AFF PECC FIL 1A	100x	1331,40	
		1290,78	
		1088,61	
		1153,22	
		1280,55	
AFF PECC FIL 1B	100x	1106,05	
		1134,42	
		1158,79	
		1151,54	
		1187,17	
AFF PECC TOB 1A	100x	1280,10	344,97
		1352,95	349,74
		1326,71	307,77
		1325,06	313,31
		1327,79	342,02
AFF PECC TOB 1B	100x	1391,69	289,94
		1367,33	345,77
		1320,93	304,19
		1335,89	296,93
		1291,90	302,98
AFF PECC TOB 2A	100x	1486,08	202,69
		1486,47	200,93
		1456,44	200,99
		1523,07	235,62
		1526,32	247,71
AFF PECC TOB 2B	100x	1492,77	225,02
		1519,34	214,00
		1497,57	246,85
		1487,50	214,88
		1548,05	204,43

<b>AFF + 10 % PECC</b>		
<b>3D OM</b>		
<b>Označení vzorku</b>	<b>Zvětšení</b>	<b>Rozměr (μm)</b>
AFF PECC FIL	10x	1549,87
		1549,89
		1560,51
		1552,02
		1546,12
AFF PECC FIL A	10x	1558,32
		1571,41
		1563,40
		1554,11
		1566,97

Příloha 4: Příložené CD se snímky 2D, 3D optické mikroskopie a SEM