

Hidrolitička razgradnja poli(mliječne kiseline)

Sloković, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:151414>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Ivan Sloković

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Ivan Sloković

Hidrolitička razgradnja poli(mliječne kiseline)

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Marica Ivanković

dr. sc. Leonard Bauer

doc. dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2023.

Zahvale

Istraživanja završnog rada provedena su u okviru projekta „Biorazgradive 3D tiskane strukture za augmentaciju kostiju“ (Projekt BIDEAS, KK.01.1.1.07.0014, voditelj projekta: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković) koji provode Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije i poduzeća 3D grupe, Sveta Nedelja. Projekt je financiran iz Europskog strukturnog i investicijskog fonda u sklopu Poziva „Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije”.

Ovim putem želim iskreno zahvaliti prof. dr. sc. Marici Ivanković na prihvaćenom mentorstvu, stručnom vodstvu, srdačnosti i strpljivosti.

Također, veliko hvala poslijedoktorandu dr. sc. Leonardu Baueru na potpori, razumijevanju i uloženom trudu prilikom izrade završnog rada. Hvala na svesrdnoj pomoći koja mi je uvelike pomogla ostvariti moj cilj.

Hvala svim dragim prijateljima i kolegama, posebice kolegici Luciji Rajković, koji su bili uz mene kroz cijeli prijediplomski studij.

Naposlijetku, najviše hvala cijeloj mojoj obitelji, bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.

Hvala vam svima!

Sažetak

Poli(mliječna kiselina) ili PLA je biorazgradljivi i bioaktivni polimer koji s vremenom postaje sve atraktivniji u području tkivnog inženjerstva radi izvrsnih svojstava. PLA je polimer koji se dobiva iz obnovljivih izvora, poput kukuruza ili šećerne trske, što ga čini ekološki prihvatljivim u usporedbi s konvencionalnim polimerima dobivenima iz fosilnih goriva. PLA se sve češće koristi u medicinskim područjima, gdje služi kao materijal za razvoj nosača, implantata i drugih materijala koji potiču regeneraciju tkiva. Svojstva PLA moguće je jednostavno prilagoditi. Dodavanjem različitih komponenata u PLA matricu mogu se prilagoditi mehanička svojstva, brzina razgradnje te interakcija s tkivom. Najčešći izazovi u korištenju PLA kompozita jesu kontrolirana razgradnja te biološki odgovor stanica domaćina.

Cilj ovog rada bio je pratiti hidrolitičku razgradnju kompozita poli(mliječne kiseline), hidroksiapatita (HAp) te kitozana u mediju koji simulira fiziološki sastav u vremenskom periodu od dva, četiri, šest odnosno osam tjedana.

Istražen je utjecaj hidrolitičke razgradnje na strukturu i svojstva pripremljenih kompozita. Karakterizacija uzoraka prije i nakon razgradnje provedena je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), mehaničkim testom na tlačnu čvrstoću te je isto tako snimljena morfologija uzoraka pretražnim elektronskim mikroskopom (engl. *Scanning electron microscopy*, SEM). Dobiveni rezultati ukazuju na zadržavanje svojstava pripremljenih kompozita tijekom cijelog perioda razgradnje. Radi navedenog, može se zaključiti kako su pripremljeni kompoziti pogodni za dugotrajno liječenje koštanih defekata.

Ključne riječi: hidroksiapatit, hidrolitička razgradnja, kitozan, poli(mliječna kiselina), PLA, tkivno inženjerstvo

Hydrolytic degradation of poly(lactic acid)

Abstract

Poly(lactic acid) or PLA is a biodegradable and bioactive polymer that is becoming increasingly attractive in the field of tissue engineering due to its excellent properties. PLA is a polymer derived from renewable sources such as corn or sugarcane, making it environmentally friendly compared to conventional polymers obtained from fossil fuels. PLA is increasingly used in medical fields, where it serves as a material for the development of scaffolds, implants, and other materials that promote tissue regeneration. The properties of PLA can be easily tailored. By adding different components to the PLA matrix, mechanical properties, degradation rate, and tissue interaction can be adjusted. The most common challenges in using PLA composites are controlled degradation and the biological response of host cells.

The aim of this study was to monitor the hydrolytic degradation of the composite of poly(lactic acid), hydroxyapatite (HAp), and chitosan in a medium simulating physiological composition over a period of two, four, six, and eight weeks.

The influence of hydrolytic degradation on the structure and properties of the prepared composites was investigated. Characterization of samples before and after degradation was conducted using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), compressive strength mechanical testing, and scanning electron microscopy (SEM). The results obtained indicate the retention of the properties of the prepared composites throughout the entire degradation period. Therefore, it can be concluded that the prepared composites are suitable for the long-term treatment of bone defects.

Key words: chitosan, hydrolytic degradation, hydroxyapatite, poly(lactic acid), PLA, hydrolytic degradation, tissue engineering

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. MLIJEČNA KISELINA – MONOMER PLA.....	5
2.1.1. PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE	6
2.1.1.1. KEMIJSKA SINTEZA MLIJEČNE KISELINE	6
2.1.1.2. PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE MIKROBIOLOŠKOM FERMENTACIJOM	7
2.2. POLI(MLIJEČNA KISELINA)	9
2.2.1. PROIZVODNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE)	10
2.2.2. SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE) KISELINE	11
2.2.2.1. FIZIKALNA SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE KISELINE)	13
2.2.2.2. KRISTALIZACIJSKA SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE KISELINE).....	14
2.2.2.3. MEHANIČKA SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE KISELINE)	15
2.2.2.4. RAZGRADNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE)	17
2.2.2.5. TOPLINSKA RAZGRADNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE).....	17
2.2.2.6. HIDROLITIČKA RAZGRADNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE)	17
2.2.2.7. LANČANA HIDROLIZA	18
2.2.2.8. ENZIMSKA RAZGRADNJA	18
2.2.3. BOKOMPATIBILNOST POLI(MLIJEČNE KISELINE).....	19
2.3. HIDROKSIAPATIT	19
2.3.1. SINTEZA HIDROKSIPATITA	20
2.3.2. FIZIKALNA I TOPLINSKA SVOJSTVA HIDROKSIAPATITA.....	20
2.3.3. MEHANIČKA SVOJSTVA HIDROKSIAPATITA	20
2.4. HITIN I KITOZAN	21
2.5. KOMPOZITNI MATERIJALI.....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. MATERIJALI.....	24

3.2.	HIDROLITIČKA RAZGRADNJA.....	25
3.3.	KARAKTERIZACIJA MATERIJALA	26
3.3.1.	INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVIM TRANSFORMACIJAMA	26
3.3.2.	ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	27
3.3.3.	MEHANIČKA KARAKTERIZACIJA.....	28
4.	REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1.	MEHANIČKA KARAKTERIZACIJA.....	29
4.2.	PROMJENA MASE UZORAKA	33
4.3.	VIBRACIJSKA SPEKTROSKOPIJA	34
4.4.	ANALIZA MIKROSTRUKTURE.....	36
5.	ZAKLJUČAK	38
6.	POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA	39
7.	LITERATURA.....	40
8.	PRILOG.....	43
8.1.	Prilog A. Tablične vrijednosti karakterizacije mehaničkih svojstava	44
8.2.	Prilog B. Grafički prikaz krivulja naprezanje – deformacija.....	46

1. UVOD

Polimeri se, prema današnjoj predodžbi, sastoje od dugih savitljivih makromolekula, koje stalno mijenjaju oblik i ne sadrže određen, za svaku polimernu vrstu jednaki broj ponavljanih jedinica, mera, već taj broj mora biti dovoljno velik da se po definiciji IUPAC-a, s povećanjem ili smanjenjem za jednu jedinicu, većina njegovih svojstava značajno ne mijenja. Polimerne se tvari razvrstavaju na nekoliko načina i skupina. Primjerice, prema podrijetlu, polimeri se mogu svrstati na prirodne i sintetske polimere. Isto tako, polimeri se mogu podijeliti prema primjenskim svojstvima. Polimeri se dobivaju metodama polimerizacije ili modifikacijama prirodnih makromolekulnih tvari. Reakcija polimerizacije podrazumijeva proces kojim monomeri (niskomolekulni spojevi) međusobnim reakcijama stvaraju polimere, tvari vrlo velikih molekulskih masa i dimenzija [1].

Polimeri pronalaze vrlo široku primjenu u svakodnevnom životu. Primjenjuju se u raznim industrijama kao na primjer tekstilnim, prehrambenim, farmaceutskim, automobilskim, no i u medicini, elektronici te građevini. Razlog široke primjene je njihova dostupnost. Naime, prirodni se polimeri mogu pronaći u biljkama i životinjama. Najpoznatiji prirodni polimeri jesu škrob, kaučuk, svila, vuna, pamuk i biopolimeri [1]. Sintetski se polimeri najčešće dobivaju iz petrokemijskih sirovina. Neki od najšire korištenih sintetskih polimera jesu polietilen, polipropilen te poli(vinil-klorid). Različita svojstva sintetskih polimera omogućavaju njihovu široku uporabu. Svojstva ovise o strukturi, stoga polimeri sastavljeni od različitih monomernih jedinica ili nastali drukčijim polimerizacijskim reakcijama imaju znano različita svojstva. Biopolimeri kao vrsta prirodnih polimera su polimeri od kojih su izgrađeni živi organizmi, prije svega bjelančevine, nukleinske kiseline, hormoni i sl. Biopolimeri su najčešće produkt enzimski kataliziranih, lančanih reakcija polimerizacije aktiviranih monomera koji najčešće nastaju u različitim stanicama usred metaboličkih procesa [2].

Biorazgradljivi polimeri su polimeri koji podliježu biorazgradnji. Biorazgradnja je prirodni proces kojim se organske tvari u okolišu pretvaraju u jednostavnije komponente, mineraliziraju i redistribuiraju kroz elementarne cikluse kao što su ugljikov, dušikov ili sumporov ciklus kruženja. Do biorazgradnje može doći isključivo unutar biosfere radi mikroorganizama koji imaju središnju ulogu u samom procesu razgradnje [2].

Poli(mliječna) kiselina (engl. *poly(lactic acid)*, PLA) je biorazgradljivi alifatski poliester koji se može dobiti fermentacijom iz obnovljivih izvora kao što su kukuruz, krumpir i šećerna trska. PLA ima mnoštvo izvrsnih svojstava u usporedbi s ostalim alifatskim poliesterima. Neka od tih svojstava jesu visoka mehanička čvrstoća, biorazgradljivost, biokompatibilnost te niska toksičnost. Navedena svojstva omogućuju vrlo široku primjenu poli(mliječne) kiseline. Naime, ona se najčešće koristi u biomedicinskom području kao dio sustava za dostavu lijekova, materijal za izradu implantata, proteza, primjenjuje se u oftalmologiji, stomatologiji te raznim drugim djelatnostima [3].

Hidrolitička razgradnja proces je koji se javlja u polimera koji posjeduju funkcionalne skupine osjetljive na prisutstvo vode. Hidroliza podrazumijeva kemijsku reakciju cijepanja funkcionalnih grupa u reakciji s vodom. Biopolimeri često podliježu hidrolitičkoj razgradnji, tvoreći produkte koji su topljivi u vodi, prilikom čega dolazi do erozije početnoga polimera. Stoga, razgradnja je kemijska reakcija, dok se pojam erozija koristi kao fizikalni proces do kojeg dolazi uslijed same razgradnje. Hidrolitička razgradnja, to jest kidanje lanaca esterske veze poliestera, izuzetno je brzi proces, koji uzrokuje znatno smanjenje molekulske mase te opadanje mehaničkih svojstava polimera. Prateći navedene parametre tijekom same razgradnje moguće je provesti ispitivanja nužna za kontrolu, primjerice sustava za isporuku lijekova temeljenih na polimerima [4].

Cilj ovog završnog rada je istražiti utjecaj hidrolitičke razgradnje na strukturu i svojstva poli(mliječne kiseline). Karakterizacija uzorka prije i nakon razgradnje provedena je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama, pretražnim elektronskim mikroskopom, mehaničkim ispitivanjem s tlačnim opterećenjem te toplinskim metodama. Uzorci koji su ispitivani temelje se na poli(mliječnoj kiselini), hidroksiapatitu te kitozanu.

Hipoteza istraživanja je da će ispitivani materijal tijekom razgradnje pokazati slabija mehanička svojstva u usporedbi s početnim materijalom prije same razgradnje, isto tako pretpostavlja se da će doći do gubitka mase uslijed razgradnje.

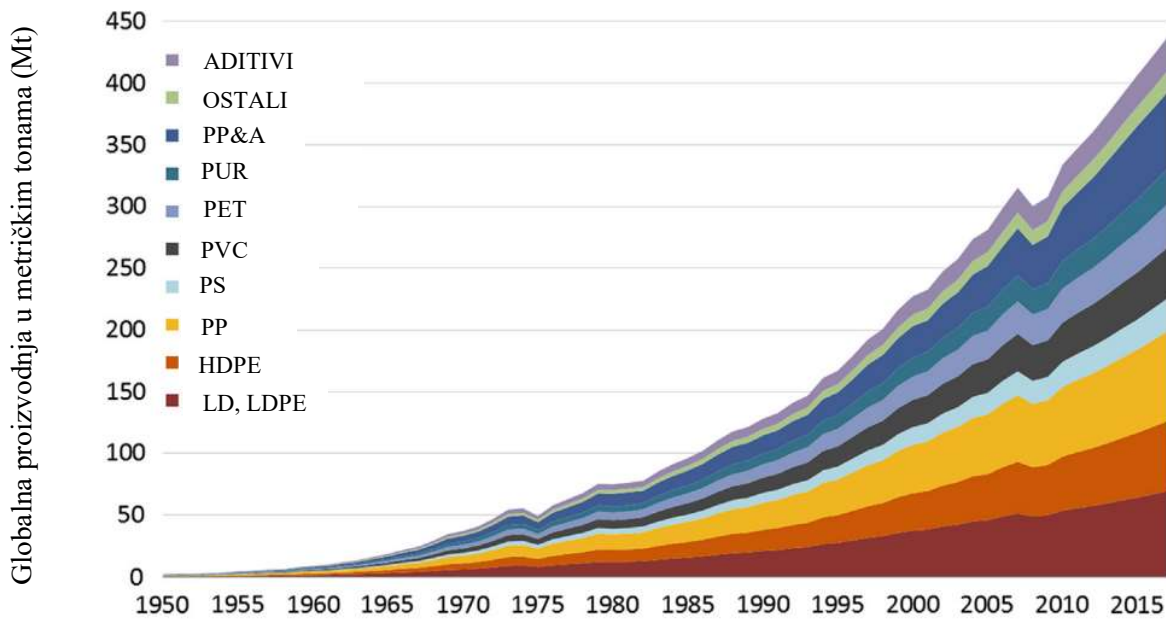
2. OPĆI DIO

Polimerima se nazivaju većina makromolekula sastavljenih od istovrsnih ponavljanih jedinica. Naziv *polimer* grčkog je podrijetla, nastao od dviju riječi, *poli* i *meros*, a prvi ga je upotrijebio švedski kemičar Jöns Jakob Berzelius još 1833. godine. Berzelius je pojmom polimer opisao kemijske spojeve koji imaju jednaki sastav, a razlikuju se veličinom molekulske mase.

Polimerne tvari razvrstavaju se na nekoliko načina i skupina. Osnovna je podjela na prirodne i sintetske polimere (podjela prema podrijetlu). Nadalje, sintetski se polimeri mogu dijeliti prema reakcijskom mehanizmu nastajanja na stupnjevite i lančane, prema vrsti ponavljanih jedinica na homopolimere i kopolimere, no isto tako i prema oblicima makromolekula. Druga se podjela temelji na primjenskim svojstvima polimera. Prema primjenskim svojstvima polimeri mogu biti plastomeri, duromeri, elastomeri, vlakna. Nadalje, mogu služiti kao premazi, ljepila, veziva, katalizatori, ionski izmjenjivači, poboljšivači viskoznosti, membrane i slično. [1]

Homopolimerima nazivaju se polimeri koji se sastoje od makromolekula kemijski istovrsnih ponavljanih jedinica, a kada polimer sadrži dvije ili više vrsta ponavljanih jedinica naziva se kopolimerom. Statistički je kopolimer najzastupljenija vrsta kopolimera, a osim dva monomera u reakciji mogu sudjelovati i tri monomera [1]. Polimeri su najčešće organskog podrijetla te se pretežito sastoje od ugljika, vodika, kisika, dušika i slično, a rjeđe sadrže i druge, anorganske elemente, stoga ovisno o udjelu određenih elemenata polimeri mogu biti poluorganski ili potpuno anorganski.

Prvi potpuno sintetski polimer priređen je 1907. u SAD reakcijom fenola i formaldehida. Kasnije je navedeni polimer modificiran te se danas najčešće primjenjuje kao izolacijski materijal u električnim uređajima i kao ljepilo za drvo. Opisani materijal danas je poznatiji pod pojmom bakelit. Masovna proizvodnja sintetskih polimera započela je tijekom Drugog svjetskog rata. Nakon završetka Drugog svjetskog rata proizvodnja sintetskih polimera nastavlja eksponencijalni rast (Slika 1.) [5]. Na grafičkom prikazu vidljiva je proizvodnja isključivo polimera temeljenih na naftnim sirovinama.

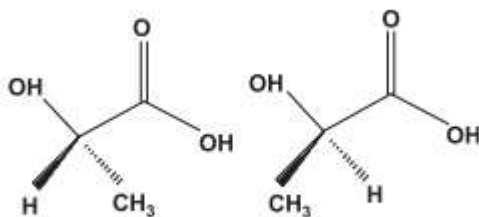


Slika 1. Globalna proizvodnja primarnih plastičnih produkata od 1950. do 2017. godine [5].

Prema *European Bioplastics*, ako dođe do nastavka spomenutog trenda proizvodnje sintetskih polimera iz naftnih sirovina, globalna će proizvodnja doseći vrijednost od 1,1 bilijuna tona do 2050. godine, dok će ukupna proizvodnja takvih materijala u razdoblju od 1950. do 2050. biti 34 bilijuna tona [6]. Iz navedenih podataka može se zaključiti kako je održivo upravljanje polimerima vrlo važno. Naime, recikliranje sintetskih polimera igra važnu ulogu u smanjenju otpada i očuvanju mnogih resursa. Sintetski polimeri temeljeni na naftnim sirovinama, primjerice plastika, imaju vrlo dugi životni vijek, stoga mogu uzrokovati ozbiljne ekološke probleme ako se ne recikliraju ispravno. No, nerijetko postoje različiti izazovi vezani uz recikliranje, poput kontaminacije plastike, nedostatka infrastrukture za recikliranje u nekim područjima te problemi ekonomske održivosti procesa recikliranja. Radi prethodno navedenih razloga, sve je veći interes prema polimerima dobivenima iz obnovljivih izvora. Polimeri dobiveni iz obnovljivih izvora sve su više zastupljeni radi manjeg utjecaja na okoliš. Razlog manjeg utiska na okoliš prirodnih ili sintetskih biorazgradljivih polimera je njihova tendencija spontane razgradnje uslijed utjecaja različitih faktora [7].

2.1. MLIJEČNA KISELINA – MONOMER PLA

Za otkriće mliječne kiseline u kiselom mlijeku zaslužan je kemičar Carl Wilhelm Scheele godine 1780. Mliječna kiselina ili 2-hidroksipropanska kiselina jednostavna je kiralna organska molekula koja se javlja u dva moguća oblika, to jest dva enantiomera (Slika 2.). Enantiomeri L- i D-mliječne kiseline osnovno se razlikuju u smjeru zakretanja polarizirajuće svjetlosti. Naime, L-izomer zakreće svjetlost u smjeru kazaljke na satu, dok D-izomer mliječne kiseline zakreće svjetlost u smjeru suprotnom od onog kazaljke na satu. No, postoji i optički neaktivni oblik mliječne kiseline, to jest racemična smjesa dvaju enantiomera [8].



L-Mliječna kiselina D-Mliječna kiselina

Slika 2. Optički izomeri mliječne kiseline [8].

Mliječna kiselina ili 2-hidroksipropanska kiselina najjednostavnija je hidroksikarboksilna, organska kiselina. Ona pripada skupini hidroksikarboksilnih kiselina radi postojanja dviju funkcionalnih skupina, karboksilne (-COOH) te hidroksilne skupine (-OH). Radi navedenih svojstava, može se zaključiti kako mliječna kiselina posjeduje svojstva alkohola, ali i kiseline. Pri 15 °C i 1 atm mliječna kiselina je žuta tekućina bez karakterističnog mirisa. Fremy je 1839. godine proveo eksperiment dobivanja mliječne kiseline kiselom fermentacijom iz različitih ugljikohidrata kao što su šećeri, mlijeko, škrob te dekstrin. Nadalje, 1857. godine, Pasteur dolazi do zaključka kako mliječna kiselina nije komponenta mlijeka, kako se mislilo u počecima razvoja, već je ona jedan od metabolita. Danas se mliječna kiselina najčešće proizvodi na dva moguća načina, a to su kemijska sinteza iz petrokemijskih sirovina ili mikrobiološka fermentacija.

Mliječna kiselina produkt je metaboličkog procesa. Naime, početni korak pretvorbe u mliječnu kiselinu je proces glikolize u kojem glukoza prelazi u piruvat. Nadalje, u aerobnim uvjetima, piruvat dobiven procesom glikolize ulazi u mitohondrije, gdje se kao produkt razgradnje piruvata dobiva adenzin trifosfat i ugljikov dioksid. No, u anaerobnim uvjetima, ili uvjetima smanjene koncentracije kisika (tijekom fizičke aktivnosti), piruvat procesom fermentacije prelazi u mliječnu kiselinu. Opisani se proces zbiva uz pomoć enzima laktat dehidrogenaza. Mliječna kiselina je privremeni izvor energije potreban organizmu u anaerobnim uvjetima. U trenutku kada je postignuta određena koncentracija kisika, mliječna kiselina se prevodi u jetru gdje se Korijevim ciklusom, retrogradno pretvara u glukozu [9].

Kako postoje dva enantiomera mliječne kiseline, njihova se svojstva znatno razlikuju. L-mliječna kiselina prirodno je prisutna u ljudskom organizmu, dobiva se prethodno opisanim metaboličkim procesom. Dok D-mliječna kiselina nastaje vrenjem iz šećera ili drugih ugljikohidrata djelovanjem određenih anaerobnih bakterija. Budući je L-mliječna kiselina produkt metaboličkog puta, ona ne predstavlja opasnost za zdravlje, naprotiv, često se koristi i kao dodatak prehrani. S druge strane, D-mliječna kiselina je toksični metabolit koji može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme.

2.1.1. PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE

2.1.1.1. KEMIJSKA SINTEZA MLIJEČNE KISELINE

Mliječna kiselina prvi je puta kemijski sintetizirana 1863. godine. Sinteza započinje reakcijom između acetonitrila i HCN u prisustvu katalizatora pod uvjetima visokog tlaka (jednadžba 1).



Produkt prve reakcije (laktonitril) se zatim pročišćava određenim metodama kao što su destilacije te hidrolizira uz prisustvo sumporne kiseline, kako bi se dobila mliječna kiselina i sol amonijev sulfat. (jednadžba 2).



Dobivena mliječna kiselina u drugoj reakciji, sudjeluje u reakciji esterifikacije s metanolom (jednadžba 3).



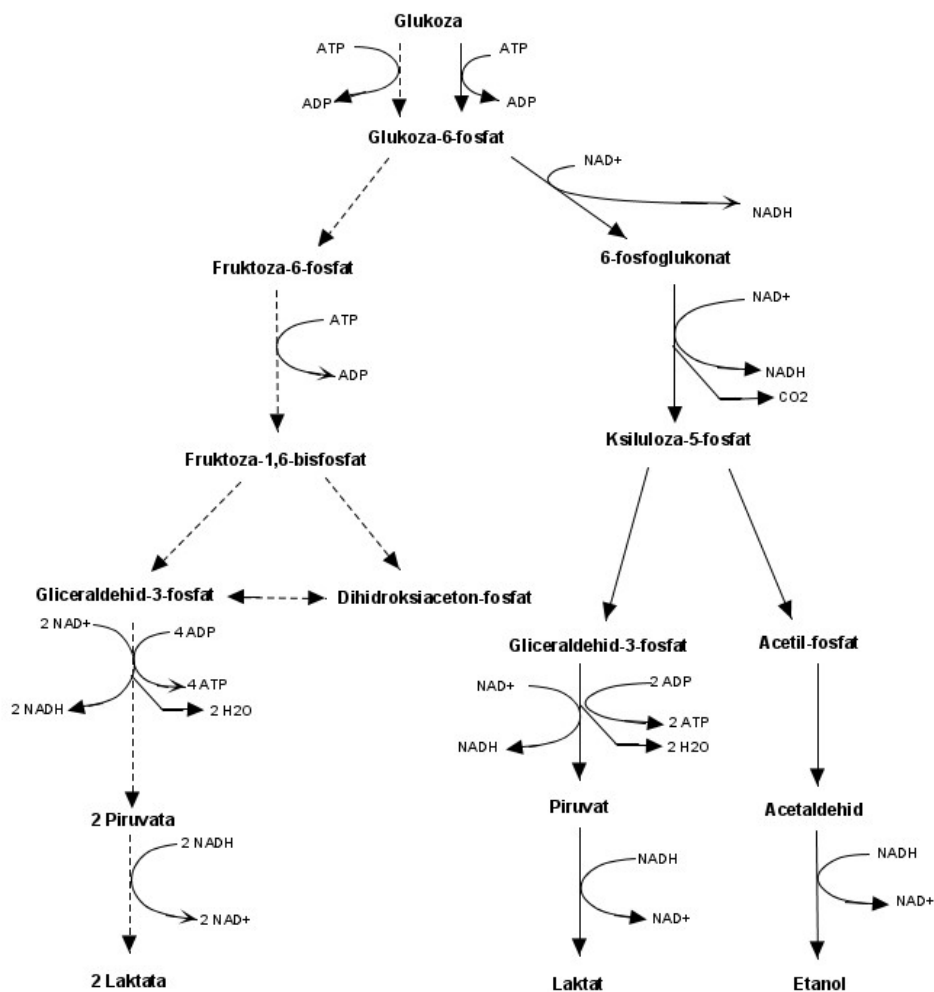
Produkt esterifikacije, metil-laktat se pročišćava destilacijom i podliježe reakciji hidrolize. Reakcijom hidrolize nastaje racemična smjesa DL-mliječne kiseline. (jednadžba 4).



Kemijska sinteza mliječne kiseline nije uobičajeni proces dobivanja iste radi visoke cijene postupka, ovisnosti o petrokemijskih sirovinama te njihovoj čistoći, no i iz razloga jer se kemijskim postupkom dobiva racemična smjesa, koja je u većini slučajeva neupotrebljiva [10].

2.1.1.2. PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE MIKROBIOLOŠKOM FERMENTACIJOM

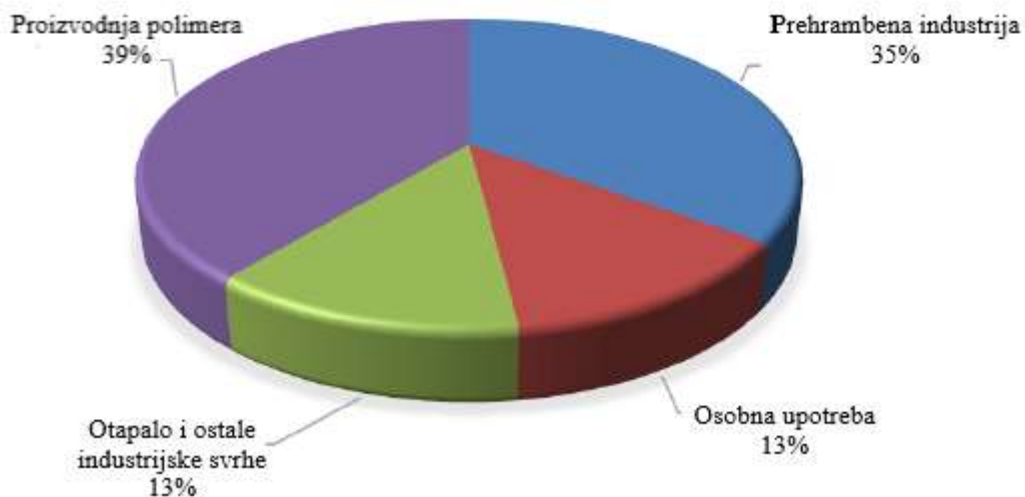
Drugi način proizvodnje mliječne kiseline temelji se na mikrobiološkoj fermentaciji iz obnovljivih izvora uz prisustvo određenih mikroorganizama. Postupak dobivanja mliječne kiseline mikrobiološkom fermentacijom puno je češći od onog kemijskom sintezom. Razlog tome su puno manji troškovi proizvodnje, budući se koriste jeftini obnovljivi izvori. Nadalje, mikrobiološkom fermentacijom dobiva se optički čista D- ili L-mliječna kiseline te je smanjen utjecaj na okoliš uz znatno manji utrošak energije radi niže temperature tijekom provedbe procesa. Mikroorganizmi koji omogućuju fermentaciju mliječne kiseline mogu biti podijeljeni u dvije skupine: bakterije i gljive. Nadalje, bakterije koje sudjeluju u procesu mogu isto tako biti podijeljene u dvije skupine, obzirom na postupak proizvodnje, a to su homofermentacijske i heterofermentacijske. Homofermentacijske bakterije prevode glukozu gotovo potpuno u mliječnu kiselinu, dok heterofermentacijske bakterije kataboliziraju glukozu u etanol, ugljikov dioksid te mliječnu kiselinu (Slika 3.). Homofermentacijski proces dobivanja mliječne kiseline puno je češći od heterofermentacijskog radi veće konverzije glukoze u mliječnu kiselinu te radi odsustva nastajanja međuprodukata [11].



Slika 3. Homofermentacijski (puna linija) i heterofermentacijski (točkasta linija) postupci dobivanja mliječne kiseline [11].

Sirovine za dobivanje mliječne kiseline mikrobiološkim putem moraju biti jeftine, nekontaminirane, uz visoku konverziju te mogućnost fermentacije bez prethodne obrade. U slučaju korištenja rafiniranih sirovina, troškovi pročišćavanja znatno su smanjeni, no takav je pristup ekonomski neprihvatljiv budući su rafinirani ugljikohidrati izrazito skupi. Najčešće korištene sirovine jesu melasa, raž, pšenica, kukuruz, krumpir, ječam, otpadni papir, drvo i sirutka [10].

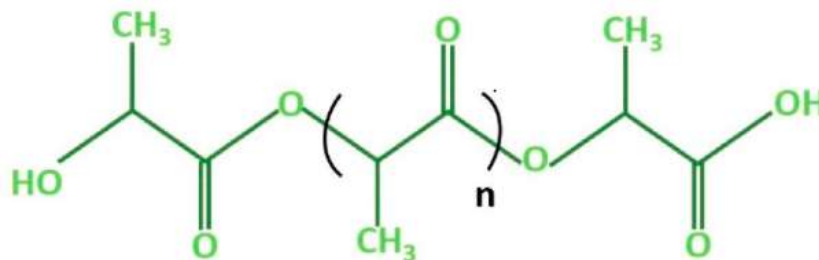
U posljednje vrijeme potražnja za mliječnom kiselinom ubrzano raste. Razlog visoke potražnje je široka primjena u kemijskoj, farmaceutskoj te prehrambenoj industriji. Nadalje, mliječna je kiselina izrazito korisna i u tekstilnoj industriji kao primjerice fiksator boje. U kemijskog industriji, mliječna se kiselina koristi kao prekursor za dobivanje etanola, propilen glikola i akrilnih polimera. Najveća je potražnja za mliječnom kiselinom u proizvodnji polimera, u većini slučajeva, poli(mliječne kiseline) [10].



Slika 4. Upotreba mliječne kiseline u svijetu [10].

2.2. POLI(MLIJEČNA KISELINA)

Poli(mliječna kiselina) izaziva veliki interes kao jedan od najinovativnijih materijala koji se trenutno razvijaju za različite primjene. Poli(mliječna kiselina) je polimer koji je termoplastičan i biorazgradljiv, takve ga karakteristike čine privlačnim za medicinske primjene. Također, njegova biokompatibilnost uvelike doprinosi pojačanom interesu za uporabu u medicinske svrhe. Morfologija površine, poroznost te kemijska svojstva površine ključni su za uporabu u medicinske svrhe. Formula polilaktida je $(C_3H_4O_2)_n$ odnosno $[-C(CH_3)HC(=O)O-]_n$. Struktura poli(mliječne kiseline) prikazana je na Slici 5. [12].



Slika 5. Struktura poli(mliječne kiseline) [12].

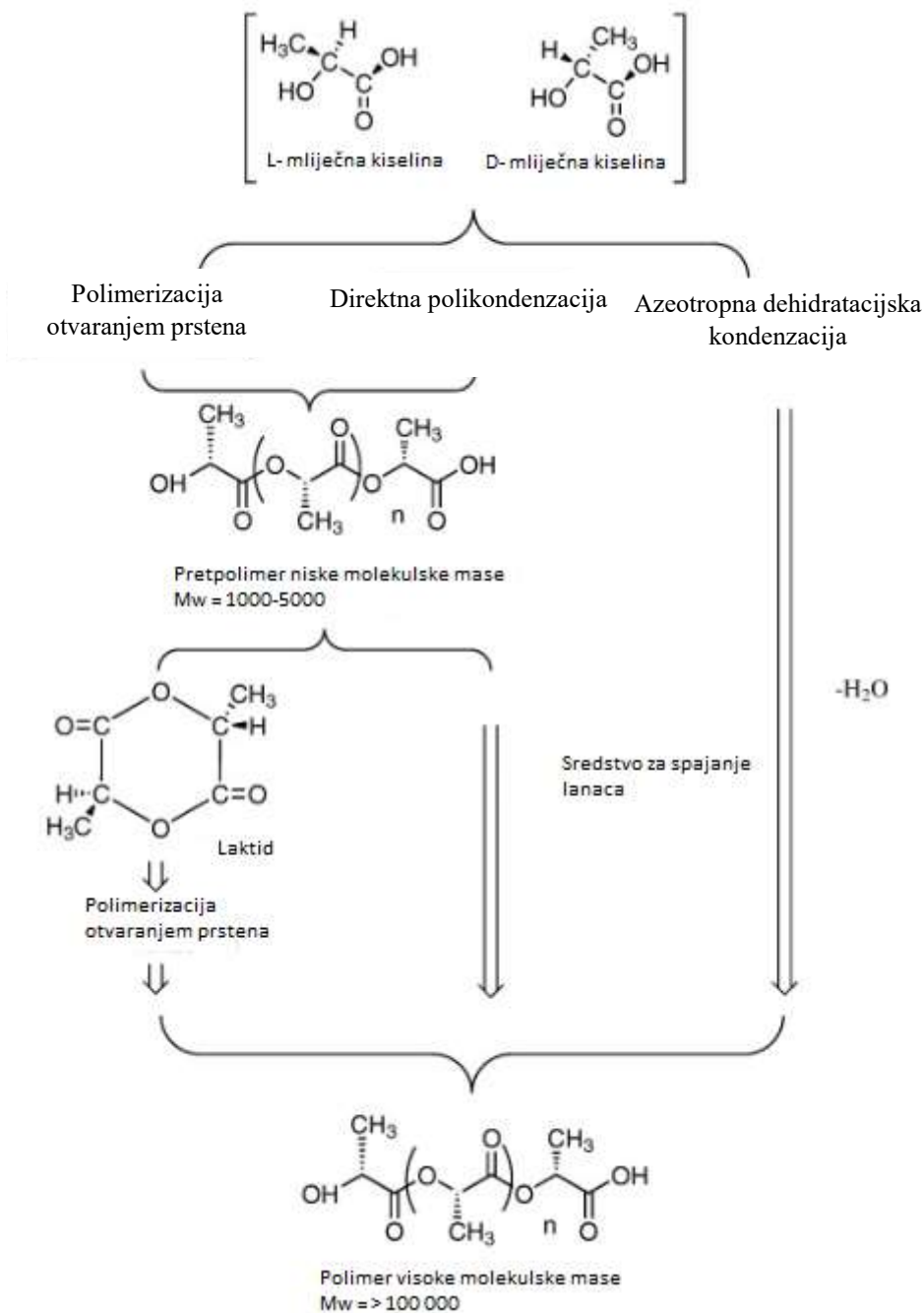
Polimer mliječne kiseline prvi je puta sintetizirao Wallace Carothers 1932. godine u DuPont laboratoriju, zagrijavanjem mliječne kiseline u vakuumu. U počecima rada s polimerima, cilj je bio unaprijediti proces polimerizacije u svrhu dobivanja polimera visoke molekulske mase. Razlog interesa za polimerima visokomolekulske mase leži u spoznaji da svojstva polimera ovise o molekularnoj masi. Svojstva koja ovise o molekularnoj masi, a vrlo su važna za primjenu polimernih materijala, jesu ponajprije mehanička svojstva. Općenito, mehanička svojstva polimera viših molekularnih masa bolja su od onih nižih molekularnih masa [12].

Poli(mliječna kiselina) ili polilaktid je sintetski, alifatski poliester dobiven iz mliječne kiseline. Ovisno o duljini lanca poli(mliječne kiseline) njezina je uporaba drukčija. Primjerice, za proizvodnju ambalaže, lanac bi trebao sadržavati 700 do 1400 monomera. Što je znatno više od klasičnih sirovina za pripremu ambalaže gdje je broj monomera u lancu od 100 do 200. Iz navedenog se može zaključiti kako je proizvodnja ambalaže na temelju PLA znatno skuplja. No, PLA zato pokazuje izvrsne mogućnosti za potrebe tkivnog inženjstva.

Tkivno inženjstvo temelji se na razvoju alternativnog pristupa liječenju koštanih defekata upotrebom biorazgradljivih i biokompatibilnih struktura kao privremenih potpora za adheziju stanica, proliferaciju i regeneraciju tkiva. Poli(mliječna kiselina) jedan je od najčešće korištenih biorazgradljivih polimera radi niske temperature taljenja i izvrsnih mehaničkih svojstava [13].

2.2.1. PROIZVODNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE)

PLA je moguće proizvesti na tri različita načina, a to su: direktna polikondenzacija, azeotropna dehidratacijska kondenzacija, te polimerizacija otvaranjem prstena.



Slika 6. Industrijski postupak dobivanja PLA visoke molekulske mase [13].

Krajnji cilj sinteze PLA dobivanje je polimera visoke molekulske mase, budući je jedino polimer visoke molekulske mase upotrebljiv.

Direktna polikondenzacija proces je koji uključuje tri glavna koraka. Prvi korak je uklanjanje vode, zatim slijedi oligomerna polikondenzacija te naposljetku polikondenzacija taljenjem visokomolekularne PLA. Proces direktne kondenzacije teoretski je najisplativiji proces proizvodnje visokomolekularne PLA, no nužnost uporabe agensa za spajanje lanaca te pomoćnih sredstava poskupljuje te komplicira sam proces.

Azeotropnu dehidratacijsku kondenzaciju, kao sljedeći način dobivanja PLA visoke molekule mase, usavršila je japanska tvrtka *Mitsui Toatsu Chemicals INC*. Prednost procesa je provedba istog bez upotrebe agensa za spajanje lanaca. PLA se dobiva direktnom kondenzacijom, a voda se konstantno odvodi azeotropnom destilacijom.

NatureWorks LLC, glavni je proizvođač PLA visoke molekulske mase. Proces se sastoji od nekoliko koraka. Prvi od njih je kondenzacija mliječne kiseline čime se dobiva PLA niske molekulske mase. Kontroliranom depolimerizacijom iz nisko molekularne PLA dobiva se ciklički dimer ili laktid. Dobiveni se laktid zatim pročišćava destilacijom. Otvaranjem prstena laktida, uz prisutstvo katalizatora, nastaje PLA kontrolirane molekulske mase [13].

2.2.2. SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE) KISELINE

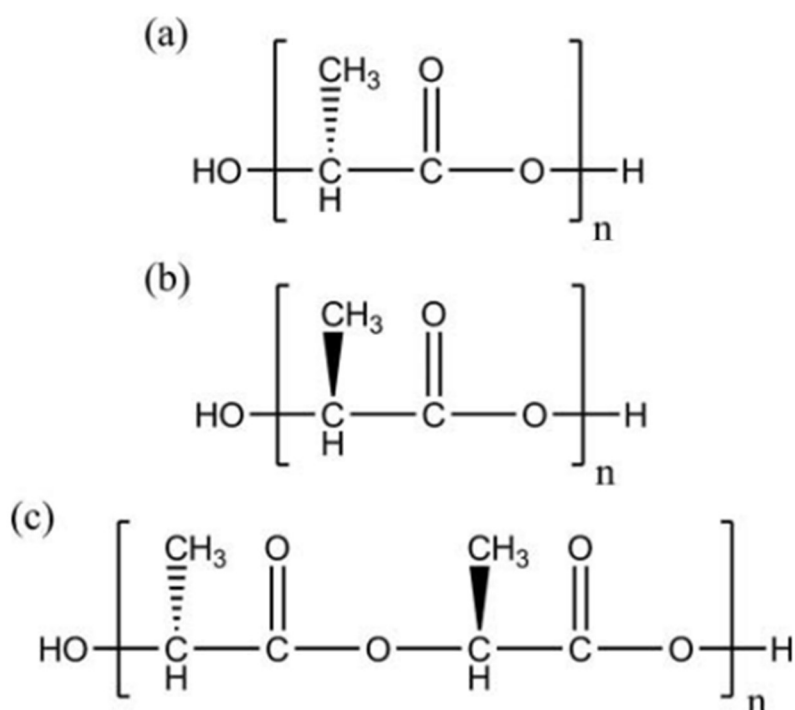
Poli(mliječna kiselina) nosi sa sobom niz prednosti. PLA je biorazgradljivi i kompostabilni polimer, što ga čini ekološki prihvatljivim. Nadalje, PLA je biokompatibilni materijal što ga čini izvrsnim za medicinsku primjenu. Svojstva PLA ovise o izomerima od kojih je isti proizveden, procesnoj temperaturi, vremenu taljenja prilikom proizvodnje te o molekulskoj masi. Na slici 7. prikazane su granule PLA.



Slika 7. Granule poli(mliječne kiseline) [14].

PLA privlači veliku pozornost u posljednjih 20 godina zbog jednostavne obradivosti i dobrih svojstava u usporedbi s drugim biorazgradljivim polimerima. PLA odlikuju viša čvrstoća i žilavost u usporedbi s polistirenom (PS) ali i loša barijerna svojstva propusnosti plinova poput vodene pare i metana. Na primjer, iako se žilavost poli(mliječne kiseline) nalazi između žilavosti polistirena i dalje je niža od žilavosti materijala poput polietilentereftalata (PET) i polikarbonata (PC). Navedena ograničenja u žilavosti djelomično utječu na opseg primjene PLA kao strukturnog materijala. Nadalje, u biomedicinskim primjenama, upotreba PLA je ograničena njenom sporom brzinom biorazgradnje i hidrofobnosti [15].

Budući je mliječna kiselina kiralna molekula, poli(mliječna kiselina) može egzistirati u obliku čiste poli-L-mliječne kiseline (PLLA), čiste poli-D-mliječne kiseline (PDLA) te poli-D,L-mliječne kiseline (PDLLA), strukture navedenih prikazane su na Slici 8 [16].



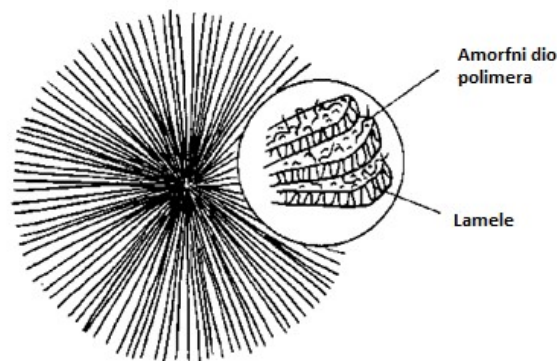
Slika 8. Kemijska struktura (a) poli(L-mliječne kiseline) (PLLA); (b) poli(D-mliječne kiseline) (PDLA) i (c) poli(D, L-mliječne kiseline) (PDLLA) [16].

L-izomer mliječne kiseline biološki je metabolit te čini najveći udio poli(mliječne kiseline) dobivene iz obnovljivih izvora. Ovisno o sastavu određenih aktivnih L- i D-enantiomera, PLA može kristalizirati u tri moguće forme (α , β i γ). Poli(L-mliječna kiselina), to jest PLLA, privukla je značajnu pažnju zahvaljujući izvrsnoj biokompatibilnosti i mehaničkim svojstvima. Međutim, dugo vrijeme razgradnje s visokim udjelom kristalnosti nastalih fragmenata može uzrokovati upalne reakcije u biomedicinskoj primjeni. Kako bi se prevladali navedeni problemi, često se kombiniraju L-mliječna kiselina i D,L-mliječna kiselina pri čemu se nastali polimer puno brže razgrađuje bez stvaranja kristalnih fragmenata tijekom procesa.

PLA s udjelom PLLA većim od 90 % uglavnom je kristalno uređena, smanjenjem udjela PLLA to jest čiste poli-L-mliječne kiseline smanjuje se kristalna uređenost te shodno tome PLA postaje amorfija [15].

2.2.2.1. FIZIKALNA SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE KISELINE)

Fizikalna svojstva materijala opisuju fizičke karakteristike materijala kao što su boja, električna i toplinska vodljivost, magnetizam, optička svojstva koja nisu posljedica djelovanja vanjskih uvjeta. Polimeri se općenito mogu nalaziti u djelomično kristalnom ili amorfnom stanju. Kristalasti (engl. semi-crystalline) polimeri sadrže ponavljajuće jedinice koje omogućuju slaganje lanaca u područja više gustoće, to jest lamele. Nastajanje lamela poboljšava mehanička svojstva kristalastog polimera u odnosu na amorfni analogni polimer. Niti jedan polimer ne egzistira u potpunom kristalnom obliku. Stoga, svaki kristalasti polimer sadrži kristalni dio i amorfni dio. Kristalni dio podrazumijeva lamele, dok amorfni dio opisuje prostor izvan lamela te između slojeva polimera. Opisana struktura polimera naziva se sferulitna te je ona prikazana na Slici 9.



Slika 9. Sferulitna struktura polimera [17].

PLA visoke molekulske mase je bezbojni, sjajni te kruti polimer. Amorfni polimer mliječne kiseline topljiv je u većini organskih otapala kao što su tetrahidrofuran, benzen, acetonitril i dioksan. Nadalje, PLA pokazuje umjerenu propusnost za kisik i vodu te istovremeno iskazuje visoku otpornost na masnoće i ulja. Navedena svojstva čine PLA svestranim materijalom za različite primjere, primjerice u prehrambenoj industriji kao ambalažni materijal [12].

Fizikalna svojstva znatno ovise o stereokemiji te molekulskoj masi. Povećanjem molekulske mase PLA, kristalna uređenost opada, radi nastajanja dugih polimernih lanaca. S druge strane, kako bi se lančane strukture ispreplele i produljile, dolazi do povećanja čvrstoće pri rastezanju i viskoznosti [18]. Fizikalna svojstva znatno ovise o temperaturi staklastog prijelaza, T_g . Temperatura staklastog prijelaza ili staklište se definira kao temperatura pri kojoj se segmenti ugljikovih lanaca počinju koordinirano gibati. Pri toj temperaturi, amorfne regije polimera prelaze iz rigidnog (staklastog) u fleksibilnije (gumasto) stanje. Staklište ovisi o kemijskoj strukturi polimera. Naime, prisustvo polarnih atoma, funkcionalnih grupa te duljina bočnih lanaca i mogućnost stvaranja lamela povećavaju staklište polimera. Kristalasti

polimeri pri temperaturi višoj od temperature staklastog prijelaza počinju omekšavati, no tek pri temperaturi taljenja, T_m prelaze u kapljevito stanje. Općenito, T_m poprima više vrijednosti od T_g . Pri temperaturi višoj od T_g , ali ispod T_m , polimer se nalazi u „gumastom“ stanju. Fizičko značenje temperature staklastog prijelaza je zapravo mjera mobilnosti segmenta. T_g je prijelazna temperatura pri kojoj se segmenti polimera počinju kretati (povećanjem temperature) ili „smrzavati“ (hlađenjem) [19].

Fizikalna svojstva PLA, PLLA i PDLLA prikazana su u tablici 1.

Tablica 1. Fizikalna svojstva PLA, PLLA i PDLLA [15].

Svojstvo	Mjerna jedinica	Tip biopolimera		
		PLA	PLLA	PDLLA
Relativna gustoća	g/cm ³	1,21-1,25	1,24-1,30	1,25-1,27
Temperatura taljenja	°C	150-162	170-200	am ^a
Staklište	°C	45-60	55-65	50-60

^aam – PDLLA se nalazi u amorfnom stanju, stoga ne posjeduje temperaturu taljenja

Iz tablice je vidljivo kako stereokemija znatno utječe na fizikalna svojstva polimera. Povećanje udjela D-izomera može dovesti do smanjenja udjela kristalnosti, što rezultira sniženjem temperature taljenja. Temperatura taljenja i temperatura staklastog prijelaza mogu se smanjiti korištenjem plastifikatora. Međutim, PLA se vrlo često miješa s drugim polimerima kao što su polietilen (PE), polistiren, polipropilen (PP) i kitozan kako bi se poboljšala određena svojstva [16].

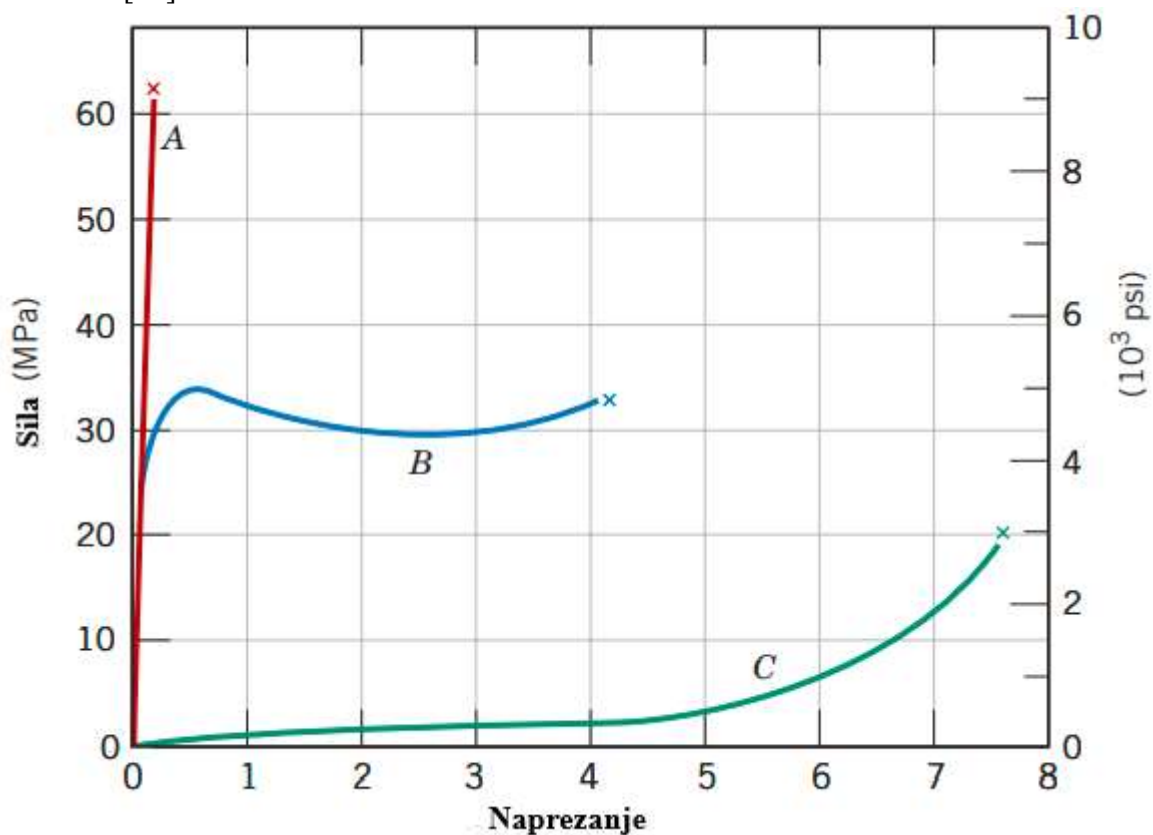
2.2.2.2. KRISTALIZACIJSKA SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE KISELINE)

Stupanj kristalnosti iznimno je bitno svojstvo polimera. Različita svojstva polimera, uključujući tvrdoću, čvrstoću, vlačnu čvrstoću, žilavost i temperatura taljenja ovise o udjelu kristalnih zona u polimeru. Reološka i termalna svojstva ovise o strukturi polimernog lanca, općenito vrijedi da razgranati polimerni lanci brže kristaliziraju od ravnolančanih analoga.

PLA može kristalizirati u tri različita oblika. Prvi od mogućih oblika je α oblik, navedeni oblik nastaje prilikom hladne kristalizacije ili taljenja. Nadalje, β oblik je posljedica mehaničkog rastezanja stabilnijeg α oblika, γ oblik nastaje prilikom razvijanja na supstratima heksametil benzenu. PLA ima talište pri 180 °C ako dolazi do kristalizacije pri 100 °C. PLA se može obrađivati pri minimalnoj temperaturi od 20 °C pa sve do 200 °C. PLA koja sadrži više od 90 % PLLA većinski se nalazi u kristalnoj formi, dok se manje optički čista PLA nalazi u amorfnom obliku. Morfologija PLLA se mijenja između perioda nukleacije i rasta kristala. Sferulitna struktura PLLA prisutna je pri temperaturi ispod 145 °C, povišenjem temperature iznad 150 °C, tijekom kristalizacije, primjetna je heksagonalna lamelarna kristalna morfologija. Stupanj kristalnosti polilaktida može se povećati postupnim hlađenjem, kako bi se dobila bolja toplinska otpornost materijala [20].

2.2.2.3. MEHANIČKA SVOJSTVA POLI(MLIJEČNE KISELINE)

Mehanička svojstva materijala opisuju ponašanje istog prilikom opterećenja koja mogu biti vlačna, tlačna, oscilirajuća ili stalna pri određenoj temperaturi. Mehanička svojstva polimera definiraju se vrijednostima kao što su modul elastičnosti (Youngov modul elastičnosti), granice elastičnosti i čvrstoće pri rastezanju. Za većinu polimera koristi se jednostavna metoda mehaničkog naprezanja. Metodom mehaničkog naprezanja dobiva se krivulja ovisnosti sile o naprezanju. Za polimerne materijale karakteristična su tri različita tipa ovisnosti sile o naprezanju (Slika 10). Krivulja A prikazuje ponašanje krhkog polimera, budući dolazi do njegovog loma dok se istovremeno elastično deformira. Ponašanje plastičnog materijala opisuje krivulja B, na krivulji B vidljiva je početna deformacija koja je elastična, koja zatim slijedi grananje i regija plastične deformacije. Naposljetku, deformacija prikazana krivuljom C potpuno je elastična te je karakteristična za klasu polimera nazvanu elastomeri [21].



Slika 10. Graf sila-naprezanje za različite vrste polimera [21].

Na mehanička svojstva polimera utječu molekulska masa i stupanj kristalnosti kao strukturni faktori, no isto tako okolišni faktori kao što su temperatura, primijenjena sila ili atmosfera.

Mehanička svojstva PLA mogu biti vrlo raznolika, no bitno je napomenuti da kristalasta PLA ima bolja mehanička svojstva od amorfne PLA. Nadalje, molekulska masa i stereokemija također znatno utječu na mehanička svojstva. Udio određenog monomera u polimeru može se prilagoditi sintezom PLA iz različitih omjera D i L laktida. Također je moguće modulirati molekulsku masu polimera dodavanjem specifičnih funkcionalnih skupina kao što su hidroksilna skupina ili voda [22].

U tablici 2. dana su mehanička svojstva PLA, PLLA te PDLLA.

Tablica 2. Mehanička svojstva PLA, PLLA te PDLLA [22].

Svojstvo	Mjerna jedinica	PLA	PLLA	PDLLA
σ	MPa	21,0-60,0	15,5-150	27,6-50,0
E	GPa	0,35-3,50	2,70-4,14	1,00-3,45
ε	%	2,50-6,00	3,00-10,0	2,00-10,0
σ^*	Nm/g	16,8-48,0	40,0-66,8	22,1-39,4
E^*	kNm/g	0,28-2,80	2,23-3,85	0,80-2,36

σ – vlačno naprezanje, E – Youngov modul elastičnosti, ε – krajnje naprezanje,
 σ^* - specifično vlačno naprezanje, E^* - specifičan vlačni modul

2.2.2.4. RAZGRADNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE)

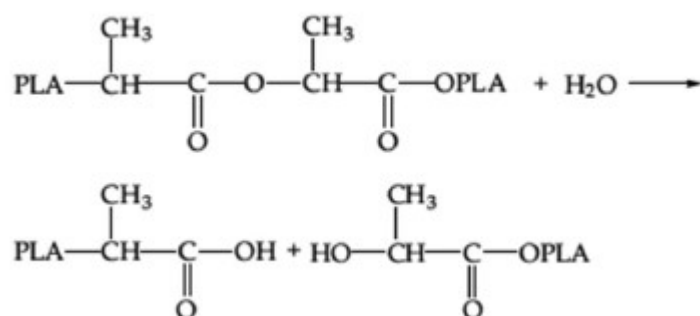
Razgradnja polimera može biti potaknuta termalno, hidrolizom, biološkom aktivnošću, oksidacijom, fotolizom ili radiolizom. Budući PLA sadrži tercijarne vodikove atome (atomi vodika vezani za ugljik koji je vezan za tri druga ugljika) moguća je oksidacijska degradacija. Faktori koji utječu na razgradnju su veličina i oblik čestica, temperatura, vlažnost, stupanj kristalnosti te molekulska masa. Primjerice, povećanjem molekulske mase polimera povećava se i temperatura staklastog prijelaza što otežava postupak razgradnje. Nadalje, viši stupanj kristalnosti također otežava proces razgradnje. Tijekom hidrolitičke razgradnje amorfne PLA, kristalnost polimera povećava se uslijed reakcija cijepanja [23].

2.2.2.5. TOPLINSKA RAZGRADNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE)

PLA gubi toplinsku stabilnost pri temperaturi višoj za 10 °C od točke taljenja. Toplinska razgradnja uzrokuje razdvajanje lanaca te smanjenje molekulske mase polimera [23].

2.2.2.6. HIDROLITIČKA RAZGRADNJA POLI(MLIJEČNE KISELINE)

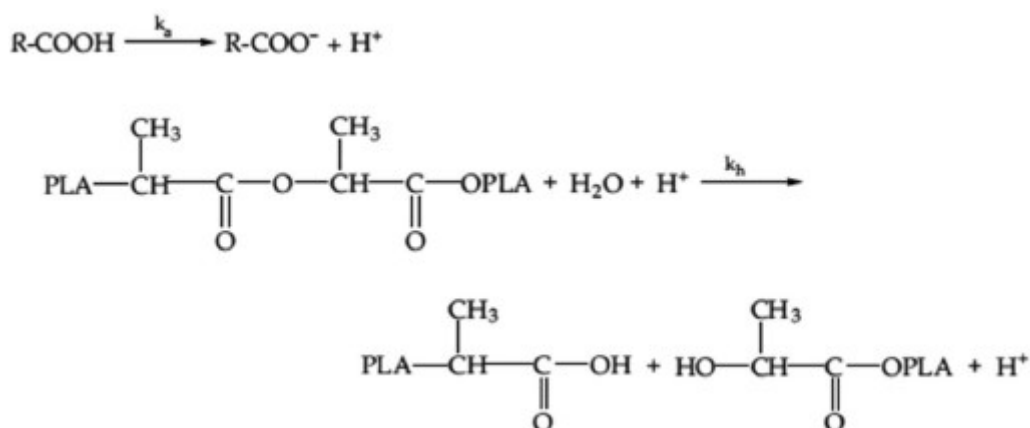
Visoka temperatura i vlažnost ubrzavaju proces razgradnje PLA. Prilikom izloženosti vodenom mediju, dolazi do cijepanja esterskih skupina čime se smanjuje molekulska masa PLA. Prilikom hidrolitičke razgradnje nastaju kisele grupe koje smanjuju pH vrijednost otopine te na taj način ubrzavaju proces razgradnje. Tijekom razgradnje, prvotno dolazi do cijepanja lanaca unutar amorfnih područja, stoga se s vremenom primjećuje povećanje stupnja kristalnosti polimera. Postoje četiri osnovna parametra koja kontroliraju hidrolitičku degradaciju čestica PLA, a to su količina adsorbirane vode, stupanj difuzije, udio lančanih fragmenata unutar polimera te topljivost produkata razgradnje. Moguća su dva mehanizma razgradnje, a to su heterogena ili površinska reakcija te razgradnja „u masi“ ili homogena erozija. Do heterogene ili površinske razgradnje dolazi ako je brzina hidrolize veća od brzine difuzije vode, što uzrokuje „smežuranje“ čestica. Kod homogene razgradnje, oblik čestice ostaje nepromijenjen, no njezin se volumen smanjuje tijekom vremena. Na slici 11. prikazan je mehanizam hidrolitičke razgradnje PLA [23].



Slika 11. Mehanizam hidrolitičke razgradnje PLA [23].

2.2.2.7. LANČANA HIDROLIZA

U prvom koraku lančane hidrolize, poliesterski lanac s većom molekulskom masom podliježe hidrolizi na oligomere koji imaju manju molekulsku masu. Podešavanjem pH vrijednosti može se kontrolirati brzina hidrolize koja ovisi i o temperaturi i o količini vlage. Kao što je vidljivo na slici 11. razgradnja PLA je primarna radi hidrolize estera koja se zbiva uzduž okosnice polimera. Prisutstvo vode nužno je za odvijanje reakcije hidrolitičke razgradnje. Propusnost PLA za vodu i autokatalitičke reakcije tijekom odvijanja hidrolitičke razgradnje dva su izazova za stabilizaciju PLA. Mehanizam autokatalitičke reakcije PLA prikazan je na slici 12. Kako bi se spriječila autokatalitička reakcija, to jest reakcija samoubrzavajućeg procesa degradacije, potrebno je smanjiti koncentraciju rezidualnog monomera. Rezidualni monomeri, to jest monomeri koji zaostaju nakon sinteze polimera, mogu djelovati kao inicijatori za reakcije degradacije. Osiguravanjem temeljitog pročišćavanja i pravilnih tehnika polimerizacije moguće je smanjiti njihovu koncentraciju te shodno time i potencijal za autokatalitičku reakciju degradacije. Nadalje, potrebno je smanjiti koncentraciju vode koja može katalizirati hidrolizu. Konačno, moguće je modificirati krajnje grupe PLA različitim kemijskim skupinama poput OH-, COOH-, Cl- i NH₂- te na taj način prilagoditi kemijska svojstva i stabilnost [23].



Slika 12. Mehanizam autokatalitičke hidrolize PLA [20].

2.2.2.8. ENZIMSKA RAZGRADNJA

U sljedećem koraku razgradnje PLA dolazi do enzimskog napada na ostatne fragmente. Enzimi mogu imati ulogu katalizatora u reakcijama hidrolize. Stupanj enzimske razgradnje znatno je manji pri višem stupnju kristalnosti. Enzimska se razgradnja većinski zbiva mehanizmom površinske to jest heterogene reakcije. Tijekom enzimske razgradnje dolazi do smanjenja molekulske mase, stoga i do slabljenja mehaničkih svojstava [23].

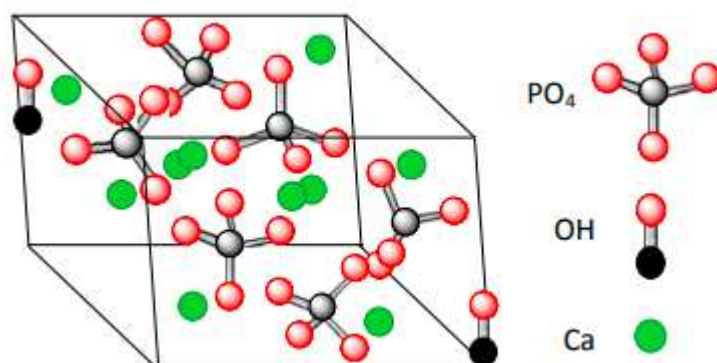
2.2.3. BIOKOMPATIBILNOST POLI(MLIJEČNE KISELINE)

Biokompatibilnost, prema IUPACu, svojstvo je materijala da u kontaktu sa živim sustavom ne izaziva nepoželjne efekte. Gledajući s biomedicinskog stajališta, biokompatibilnost podrazumijeva sposobnost materijala da djeluje uz odgovarajući odgovor domaćina prilikom određene primjene [24]. Poli(mliječna kiselina), također pokazuje biorazgradljiva svojstva. Materijal je biorazgradljiv ako isti podliježe razgradnji uz pomoć biološke aktivnosti, putem smanjenja molarne mase makromolekule. Potrebno je napomenuti kako se razgradnja polimera *in vivo* u isključivo vodenom mediju definira kao reakcija hidrolize, a ne biorazgradnje. Pojam „konačna biodegradacija“ opisuje potpunu transformaciju organskih spojeva u oksidirane ili reducirane jednostavne molekule (poput ugljičnog dioksida, metana, nitratnog ili amonijevog iona i vode), bitno je naglasiti kako u slučaju djelomične biodegradacije, preostale tvari nakon razgradnje mogu biti štetnije od početne tvari.

Sintetski biorazgradljivi polimeri, kao što su PLA, poliglikolna kiselina (PGA) te polikaprolakton (PCL), sve su prisutniji u biomedicinskom području zbog izvrsne biokompatibilnosti. Navedeni se polimeri razgrađuju kako je i prije spomenuto jednostavnom hidrolizom esterskih veza, prilikom čega nije potrebno prisustvo enzima. Produkti nastali razgradnjom biokompatibilnih polimera stvaraju netoksične produkte, koji se izlučuju putem metaboličkih puteva. Sintetski razgradljivi poliesteri primjenjuju se već tri desetljeća kao materijal za šivanje i za fiksaciju kostiju [25].

2.3. HIDROKSIAPATIT

Hidroksiapatit (HAP) pripada skupini kalcijevih apatita. Njegova je struktura slična anorganskoj fazi kostiju i zubi, stoga pronalazi vrlo široku primjenu u biomedicinskom području radi njegove biokompatibilnosti i biorazgradljivosti. Čisti stehiometrijski hidroksiapatit ima kemijsku formulu $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, odnosno $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ budući kristalnu ćeliju čine dvije jedinične formule. Omjer Ca/P za stehiometrijski čisti HAP iznosi 1,67. Hidroksiapatit kristalizira u heksagonalnoj kristalnoj rešetci s parametrima kristalne rešetke $a = b = 9,43 \text{ \AA}$ i $c = 6,88 \text{ \AA}$ (slika 13) [26].



Slika 13. Vizualizacija strukture hidroksiapatita [27].

2.3.1. SINTEZA HIDROKSIPATITA

Danas je poznato nekoliko metoda za sintezu hidroksiapatita, a neke od najistraživanijih su sol-gel sinteza, hidrotermalna sinteza, elektrodpozicija i precipitacija. Najčešća metoda dobivanja hidroksiapatita je precipitacija iz biogenih izvora ili spojeva koji potječu od živih organizama ili bioloških procesa. Precipitacijom se dobiva HAp visokog stupnja kristalnosti. Nadalje, HAp dobiven iz biogenih izvora ima mogućnost oponašanja koštanog tkiva. Najčešći izvori jesu ljuska jajeta, životinjske kosti te oklop morskih organizama. HAp sintetiziran iz kemijskih prekursora ima mnoge prednosti kao što su mogućnost kontrole omjera Ca/P, visoki stupanj kristalnosti te visoka čistoća produkta. No, postoje i nedostaci hidroksiapatita sintetiziranog iz kemijskih prekursora, kao što su nedostatak određenih iona (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Si^{2+} , Na^+ i F^-) što otežava mogućnost oponašanja koštanog tkiva. Radi navedenog može se zaključiti kako hidroksiapatit dobiven iz kemijskih prekursora ima manju biološku aktivnost [28].

2.3.2. FIZIKALNA I TOPLINSKA SVOJSTVA HIDROKSIPATITA

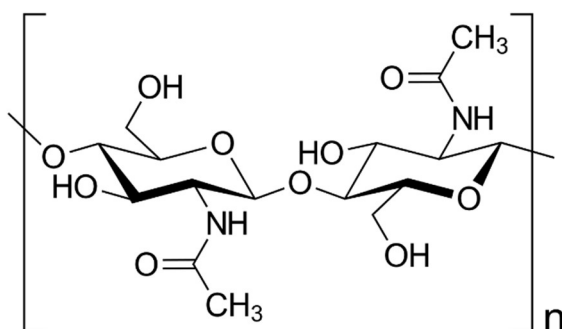
Fizikalna svojstva hidroksiapatita ovise o metodi kojom je sintetiziran. Hidroksiapatit koji je priređen u laboratoriju posjeduje niski stupanj kristalnosti, veliku specifičnu površinu te može biti vrlo porozan. S druge strane, prirodni hidroksiapatit se obično dobiva toplinskom obradom kostiju pri višoj temperaturi ($800\text{ }^\circ\text{C}$), radi čega pokazuje visoki stupanj kristalnosti. Sinterirani hidroksiapatit posjeduje stupanj poroznosti te strukturu koja odgovara prirodnoj kosti. Najstabilniji hidroksiapatit ima omjer Ca/P 1,67 te precipitira pri pH 10. Temperatura taljenja iznosi $1614\text{ }^\circ\text{C}$, a gustoća $3,16\text{ g/cm}^3$ [29].

2.3.3. MEHANIČKA SVOJSTVA HIDROKSIPATITA

Hidroksiapatit posjeduje slična mehanička svojstva onima anorganske komponente kosti. Neka od mehaničkih svojstva, kao što je tlačna čvrstoća, opadaju povećanjem mikroporoznosti materijala. Povećanjem temperature sinteriranja dobiva se praškasti hidroksiapatit veće gustoće, većih dimenzija čestica te boljih mehaničkih svojstava. Nadalje, modul elastičnosti hidroksiapatita iznosi $40 - 100\text{ GPa}$, zubne cakline 74 GPa , dentina 21 GPa i kosti $12 - 18\text{ GPa}$ [30,31]. Primjenom materijala poput aluminijeva oksida, cirkonijeva oksida, metala ili ugljikovih nanocijevi poboljšavaju se mehanička svojstva hidroksiapatita [32].

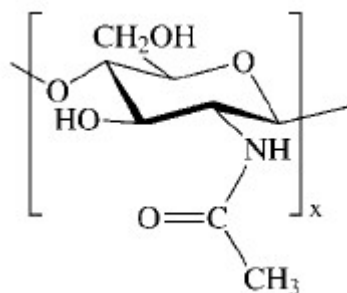
2.4. HITIN I KITOZAN

Hitin ili poli- β -(1-4)-N-acetil-D-glukozamin prirodni je polisaharid otkriven 1884. godine. Hitin se u prirodi pojavljuje u obliku uređenih kristalnih mikrovlakana prisutnih u skeletu člankonožaca ili u staničnim stijenjkama gljiva i kvasaca. Industrijski postupak proizvodnje hitina iz ljuske raka započinje otapanjem kalcijeva karbonata pogodnom kiselinom, nakon čega se alkalnom ekstrakcijom otapaju proteini. Dodatno, često se provodi postupak dekolorizacije kako bi se uklonili mogući prisutni pigmenti i dobio bezbojni produkt. Ovisno o izvoru hitina on se pojavljuje u tri moguće alotropske modifikacije (α , β i γ). α -hitin je najčešći oblik hitina, koji se pojavljuje u staničnim stijenjkama gljiva i kvasaca, ljusci jastoga, škampa i raka te u kutikulama insekata [33].



Slika 14. Kemijska struktura hitina [34].

Najistraživaniji derivat hitina je kitozan. Kitozan (CHT) je linearni kopolimer, dobro topljiv u vodi, izgrađen od dvije vrste ponavljajućih monomernih jedinica N-acetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza (acetilirana podjedinica) i 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoza (deacetilirana jedinica) koje su međusobno povezane α -(1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama. Kada stupanj deacetilacije hitina dosegne otprilike 50 %, on postaje topljiv u vodenom kiselom mediju te se naziva kitozan. Otapanje hitina događa se protonacijom -NH_2 skupine na C-2 položaju ponavljajuće jedinice D-glukozamina, čime se polisaharid pretvara u polielektrolit u kiselom mediju. U čvrstom stanju, kitozan se pojavljuje kao kristalasti polimer. Kitozan kristalizira u ortorompskoj jediničnoj ćeliji s parametrima $a = 0,807$ nm, $b = 0,844$ nm i $c = 1,034$ nm, jedinična se ćelija sastoji od dva antiparalelna kitozanska lanca [33].



Slika 15. Kemijska struktura kitozana [35].

Kitozan posjeduje kationska svojstva, što je vrlo specifično i odlikuje ga raznim svojstvima. Nadalje, hitin i kitozan su komercijalno atraktivni radi njihove lake dostupnosti te biološke kompatibilnosti, stoga pronalaze široku primjenu u tkivnom inženjerstvu, kozmetici te kao materijal za dostavu lijekova.

2.5. KOMPOZITNI MATERIJALI

Polimerni se materijali vrlo često modificiraju na način da se početni materijal kombinira s dva ili više materijala koji imaju različita svojstva tvoreći kompozit. Općenito, kompoziti se sastoje od dvije faze, a to su disperzna faza i matrica. Kompozitni materijali imaju određena svojstva, koja su značajno različita od pojedinih komponenata koje čine kompozit. Kompoziti se sintetiziraju na način da tvore homogenu i kontroliranu raspodjelu materijala.

Polimerni kompozit može biti i biokompozit. Biokompozit se sastoji od polimerne matrice ojačane određenim prirodnim tvarima (biovlaknima). Biokompozitni materijali oponašaju morfologiju živih organizama. Uloga polimerne matrice je da štiti prirodnu fazu biokompozita od mehaničkih oštećenja i degradacije uzrokovane okolišnim čimbenicima unutar biokompozita. Nadalje, biovlakna su prirodna vlakna proizvedena iz prirodnog izvora, primjerice iz drva ili određenih usjeva. Razlog povećanog interesa u proizvodnji biokompozita je manji utjecaj na okoliš tijekom proizvodnje istih, manja molekulska masa te naposljetku i manja cijena proizvodnje [36].

U polju tkivnog inženjerstva, izvanstanična matrica ima ključnu ulogu pružajući nosač koji nudi strukturalnu potporu, oblik i prikladnu površinu za stanice kako bi se iste smjestile i usmjeravale u tkivo ili organe. Za postizanje učinkovite funkcionalnosti, izvanstanična matrica mora posjedovati određene fizičke i biološke karakteristike. Ključna je adekvatna strukturalna podrška za pričvršćivanje stanica, njihovu migraciju, proliferaciju i diferencijaciju. Pritom površina izvanstanične matrice treba poticati pravilno vezivanje stanica, dok je poroznost nosača ključna za difuziju hranjivih tvari, eliminaciju otpadnih produkata te prodor stanica. Nadalje, mehanička svojstva nosača moraju biti kompatibilna s okolnim tkivima ili organima.

Sintetski materijali postaju sve važniji u biomedicinskim primjenama zbog širokog raspona dostupnih polaznih materijala, razvijenih tehnika polimerizacije i mogućnosti prilagodbe površine istih. Navedeno omogućava prilagodbu različitih svojstava, uključujući bioaktivnost, kontroliranu razgradnju te mehanička svojstva. Poli(mliječna kiselina) termopolastični (plastomerni) poliesterski je polimer koji je biokompatibilan te se razgrađuje hidrolizom alifatskih esterskih veza. Zbog svoje biorazgradljivosti i biokompatibilnosti, PLA je među preferiranim izborima za izradu nosača. Isto tako, PLA se može obraditi u različite oblike poput vlakna, filмова, poroznih struktura i 3D-printanih nosača, što ga čini svestranim za različite primjene. Jedna od ključih prednosti korištena PLA je sposobnost pružanja potrebne strukturalne podrške prilikom postupne razgradnje. Razgradnjom se omogućuje okolnim stanicama da proizvedu vlastitu izvanstaničnu matricu, što na kraju zamjenjuje sintetski nosač prirodnim tkivom. Kitozan je prirodni polisaharid koji je u vodenim otopinama s pH-vrijednosti većom od 7 obično netopljiv. Međutim, pri pH vrijednostima manjim od 5

postaje topiv zbog protonacije aaminskih skupina u kiselim otopinama. Stoga je, u usporedbi s hitinom, kitozan znatno topljiviji u vodenim otopinama i polarnim organskim otapalima. Njegova netoksičnost i proizvodi razgradnje čine ga nezaobilaznim izvorom materijala za primjenu u tkivnom inženjerstvu i regenerativnoj medicini. Kitozan ima potencijal zamijeniti kolagen zbog svojih obećavajućih svojstava kao što su biorazgradljivost i bioaktivnost, dok se čvrstoća može povećati ili umreživanjem ili razvojem kompozitnih nosača miješanjem s drugim polimerima ili materijalima. Hidroksiapatit čini oko 70 % mase ljudske kosti te je također glavni sastojak zuba. Zbog visoke bioaktivnosti i osteondukcijskih karakteristika, HAp je postao vrlo važan materijal za primjenu u tkivnom inženjerstvu, posebice za regeneraciju kostiju.

Postoji širok raspon tehnika izrade nosača koje mogu pružiti različite oblike, veličinu i poroznost. Trodimenzionalni nosači služe kao predložak pružajući privremenu strukturalnu potporu stanicama i omogućuju rast novog tkiva. Najčešće korištene tehnike jesu kemijsko i fizičko pjenjenje, emulzijsko oblikovanje, termički potaknuto fazno razdvajanje, formiranje hidrogela i tehnike slobodnog oblikovanja čvrste tvari (engl. *solid freeform fabrication*, SFF). Tehnike SFF omogućuju veću kontrolu nad topografijom nosača. Razvijene su različite SFF tehnike, uključujući i selektivno lasersko sinteriranje, stereo-litografiju, tiskanje tintom i modeliranje taloženjem spojenih slojeva (engl. *fused deposition modeling*, FDM). FDM je jednostavna tehnika koja pruža veliku fleksibilnost u rukovanju i obradi materijala. U ovom postupku strukture se stvaraju sloj po sloj depozicijom plastomernog polimera pomoću 3D pisaa. Na početku se plastomerni filament učita u pisaa. Zatim se polimer zagrijava iznad točke taljenja (ako je kristaliničan), omekša i ekstrudira kroz mlaznicu. Nakon depozicije prvog sloja slijedi drugi sloj koji se gradi prema unaprijed postavljenom dizajnu. Opisani se proces ponavlja sve dok se ne postigne željena 3D struktura nosača [37].

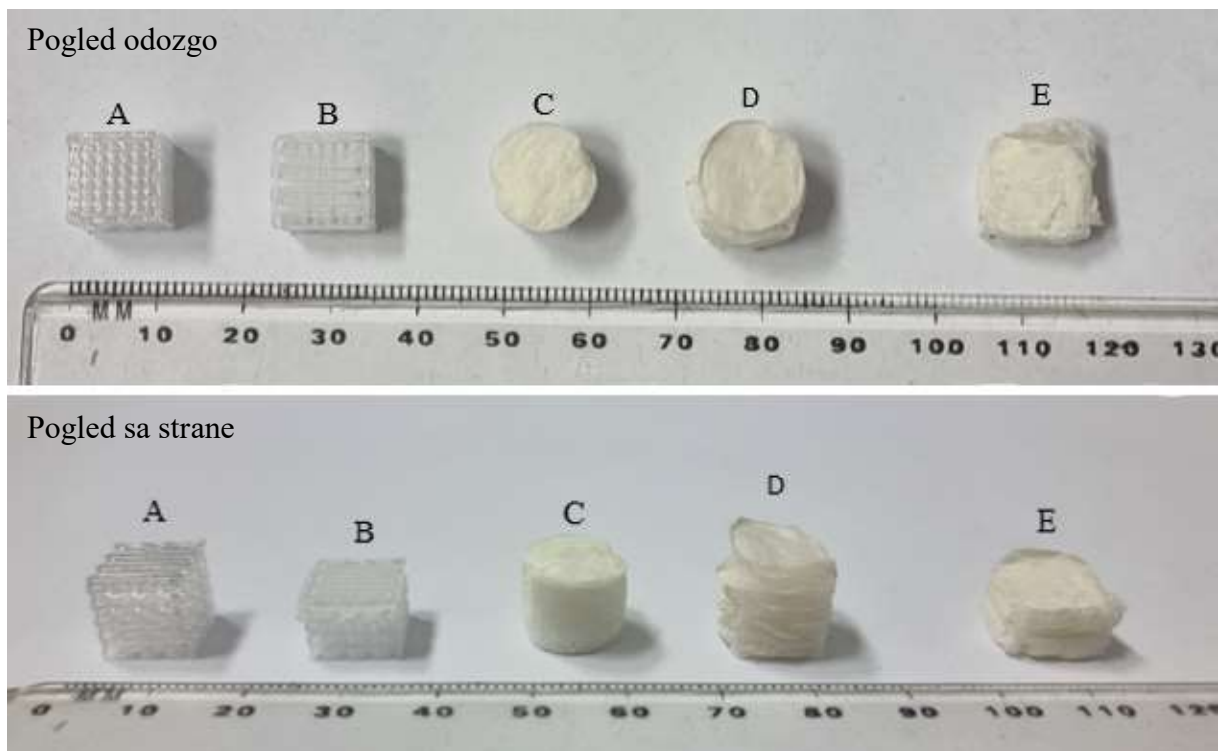
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kompozitni PLA-CHT-HAp uzorci dobiveni su kombinacijom tehnike 3D ispisa i ugradnje CHT-HAp hidrogela. Trodimenzionalni porozni nosači dimenzija 1 cm × 1 cm × 1 cm dimenzija pora od 1 mm, prikazani na slici 16 A, dobiveni su ekstruzijom Polymed Lactoprene 100M filameta, poli(mliječne kiseline) medicinske čistoće.

Kitozan-hidroksiapatini (CHT-HAp) gel ugrađen je unutar PLA nosača korištenjem potpomognute fazne separacije pri neatmosferskim uvjetima (slika 16 C). Tako dobiveni trokomponentni kompozitni uzorci podvrgnuti su hidrolitičkoj razgradnji u puferskom mediju (slika 16 D) i ispitivanju mehaničkih svojstava tlačnim opterećenjem (slika 16 B i E).

U eksperimentalnom dijelu ovog rada tijekom osam tjedana praćena je *in vitro* razgradnja kompozitnih PLA-CHT-HAp materijala u mediju koji simulira fiziološki sastav. Sistematski je praćena promjena mehaničkih i strukturnih svojstava nosača.



Slika 16. A) Porozni PLA nosač dobiven 3D ispisom. (B) porozni PLA nosač nakon provedbe mehaničkih ispitivanja tlačnim opterećenjem. (C) suhi CHT-HAp hidrogel. Suhi kompozitni PLA-CHT-HAp uzorak nakon 8 tjedana u PBS puferskom mediju s dodatkom enzima – prije (D) i nakon provedbe mehaničkih ispitivanja tlačnim opterećenjem (E).

3.2. HIDROLITIČKA RAZGRADNJA

Hidrolitička *in vitro* degradacija pripremljenih kompozitnih uzoraka provodila se u vodenim puferkim medijima pri biološkoj temperaturi od 37 °C u skladu sa zahtjevima norme (*International standard ISO 13781:2017(E): Implants for surgery – Homopolymers, copolymers and blends on poly(lactide) – In vitro degradation testing*). Ukratko, pripremljeni uzorci stavljeni su u označene staklene čašice s poklopcem u koje je dodan potreban volumen medija za razgradnju. Svaka 84 sata potrebno je zamijeniti pufer uz dodatak natrijeva azida (0,2 mg/mL). Natrij azid, NaN₃, je biocid koji se koristio kako bi se onemogućilo pojava mikroorganizama u mediju.

Razgradnja PLA-CHT-HAp kompozitnog materijala praćena je u dva različita pufera. PBS pufer pripremljen je otapanjem 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ i 0,245 g KH₂PO₄ u 1 L destilirane vodi uz dodatak 1 g lizozima kao enzima razgradnje. HBSS pufer pripremljen je također u 1 L destilirane vode otapanjem 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,14 g CaCl₂, 0,1 g MgSO₄ × 7 H₂O, 0,1 g MgCl₂ × 6 H₂O, 0,05 g Na₂HPO₄, 0,06 g KH₂PO₄, 1 g glukoze te 0,35 g NaHCO₃.

Uzorci su označeni obzirom na sastav ili medij u kojem su razgrađivani. Trokomponentni kompozitni uzorci u fosfatnom puferu (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) uz dodatak enzima, s ciljem ubrzanja razgradnje, označeni su oznakom **P**. Trokomponentni kompozitni uzorci u Hankovoj uravnoteženoj solnoj otopini (engl. *Hanks' balanced salt solution*, HBSS) bez dodatka enzima označeni su oznakom **H**.

Korištene su dvije kontrolne grupe, čija je razgradnja praćena u fosfatnom puferu uz dodatak enzima. Nemodificirani PLA nosači dobiveni 3-D ispisom, označeni slovom **C** (engl. *control*), korišteni su za usporedbu svojstava pripremljenih materijala tijekom razgradnje s nosačem sačinjenim isključivo od poli(mliječne kiseline). Kitozan-hidroksiapatitni gelovi (CHT-HAp) označeni su slovom **S** (engl. *sponge*) te služe za praćenje ponašanja hidrogela tijekom razgradnje.

Uzorci **P** i **H** rađeni su u pet replika pri vremenima razgradnje od 2, 4, 6 i 8 tjedana. Uzorci **C** i **S** su za iste vremenske periode rađeni u triplikatima.

Tablica 3. Tablični prikaz označavanja uzoraka.

PBS + lizozim + NaN ₃											HBSS + NaN ₃				
P - PLA-CHT-Hap					C - PLA			S - CHT/HAp			H - PLA-CHT-HAp				
1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	5

Svi su uzorci testirani na mehanička svojstva testom na tlačnu čvrstoću. Za FTIR analizu izdvojeni su uzorci **C** i **P** koji odgovaraju završnom osmom tjednu razgradnje. Za SEM analizu odvojeni su uzorci **C**, **S** i **P** nakon najduljeg osmog tjedna razgradnje te nulti uzorak koji nije podvrgnut hidrolitičkoj razgradnji.

3.3. KARAKTERIZACIJA MATERIJALA

3.3.1. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA S FOURIEROVIM TRANSFORMACIJAMA

Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) spektroskopska je metoda koja se temelji na apsorpciji infracrvenog zračenja pri određenim frekvencijama od strane molekula u uzorku. Prilikom ozračivanja uzorka infracrvenim zračenjem dolazi do određenih vibracija odnosno rotacija veza između molekula koje apsorbiraju svjetlo, što rezultira pojavom karakterističnih infracrvenih apsorpcijskih spektara. Glavna prednost FTIR spektroskopije u odnosu na konvencionalnu spektroskopiju je upotreba Fourierovih transformacija za analizu infracrvenih signala. Upotrebom konvencionalnih tehnika spektroskopije detektira se intenzitet svjetla u odnosu na frekvenciju, dok se FTIR spektroskopijom mjeri interferencija između referentnog i ispitivanog uzorka, što omogućuje preciznije i brže analize. FTIR analizom omogućena je identifikacija kemijskih veza i funkcionalnih grupa u ispitivanom uzorku. Osnovni dijelovi FTIR instrumenta jesu izvor infracrvenog zračenja, interferometar, komora za uzorak i detektor. Kao izvori IR zračenja najčešće se koriste silicijev karbid, volframova/halogen žarulja te Nernstov štapić (ovisno o željenom valnom području). Žarulja s volframovom niti najčešći je izvor zračenja u bliskom infracrvenom području, primjenjiva je između 320 do 2500 nm. Interferometrom se mjeri vrijeme zaostalog signala te on omogućuje dobivanje interferograma. Rad interferometra temelji se na propuštanju pola zračenja prema fiksiranom zrcalu, dok se ostala polovica usmjerava prema pomičnom zrcalu. Područje srednjeg IR spektra dijeli se na dva dijela: područje od 4000 do 2000 cm^{-1} (pripada području grupnih frekvencija, posljedica je istežanja) te na područje ispod 2000 to jest 1500 cm^{-1} (područje otiska prsta). Kao detektor infracrvenog zračenja najčešće se koristi piroelektrični detektor. Kada govorimo o IR spektroskopiji, podrazumijevamo područje spektra elektromagnetskog zračenja u rasponu od 400 do 4000 cm^{-1} . U ovom se radu FTIR spektroskopijom na uređaju Bruker Vertex 70 (slika 17.) pratila promjena karakterističnih vibracijskih vrpca materijala tijekom razgradnje pripremljenih kompozita [38,39].



Slika 17. Spektrometar Bruker Vertex 70.

3.3.2. ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Mikrostruktura pripremljenih kompozita tijekom razgradnje praćena je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) TESCAN Vega3SEM Easyprobe, prikazan na slici 18., pri energiji elektronskog snopa od 10 keV. SEM omogućuje uvid u morfologiju i mikrostrukturu materijala. Princip rada temelji se na usmjeravanju elektronskog snopa na površinu uzorka prilikom čega se javljaju fenomeni kao što su emisija sekundarnih elektrona, pojava povratno raspršenih elektrona te difraktiranih povratno raspršenih elektrona. Od spomenutih fenomena, sekundarni se elektroni emitiraju uslijed sudara sa snopom elektrona visoke energije te su oni najkorisniji za prikaz morfologije i topografije uzorka. Energija sekundarnih elektrona vrlo je mala, oni koji se generiraju na površini uzorka emitiraju se prema detektoru. Prednost elektronske mikroskopije je njezina nedestruktivna priroda. Naime, interakcija snopa elektrona i površine uzorka ne uzrokuje promjene, stoga je uzorak moguće analizirati i nekoliko puta, no i ne drugim metodama radi prethodnog neparivanja ispitivanog uzorka zlatom i paladijem uslijed nevodljivosti anorganskih materijala.



Slika 18. Pretražni elektronski mikroskop SEM Tescan Vega 3.

3.3.3. MEHANIČKA KARAKTERIZACIJA

Karakterizacija mehaničkih svojstava (tlačna čvrstoća i Youngov modul elastičnosti) kompozitnih materijala pri tlačnom opterećenju provedena je u suradnji s tvrtkom TOPOMATIKA d.o.o., Sveta Nedjelja. Korištena je Hegewald & Peschke Inspekt table 50-1 stanica s Inspekt Controller i20 AC-300 upravljačkom jedinicom, slika 19, uz korištenje detektora sile s maksimalnim očitanjem od 10 kN. Mokri kompozitni uzorci, netom izvađeni iz vodenih medija, ispitani su pri atmosferskim uvjetima s brzinom tlačenja od 0,5 mm/min. Modul elastičnosti određen je kao nagib na inicijalno linearno područje krivulje naprezanje-deformacija, a kao prekidna čvrstoća uzeta je maksimalna sila prije pucanja prve lamele uzorka.



Slika 19. Hegewald & Peschke uređaj korišten za određivanje tlačne čvrstoće i modula elastičnosti.

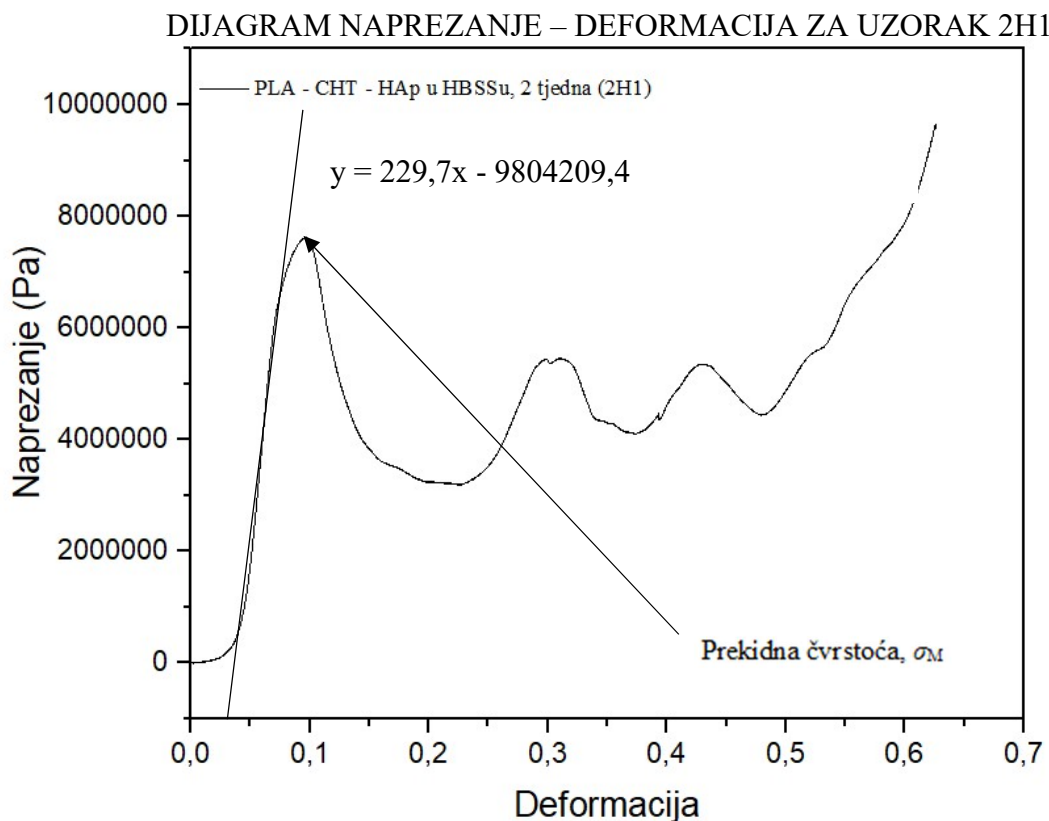
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. MEHANIČKA KARAKTERIZACIJA

Vrijednosti Youngovog modula i prekidne čvrstoće dobiveni su analizom krivulja naprezanje – deformacija dobivenih testom na tlačno opterećenje. Postupak analize prikazan je na uzorku koji je razgrađivan u HBSS-u (uzorak 2H1) na slici 20.

Dobivena je krivulja tipičnog oblika za plastične materijale. Analizom linearnog dijela krivulje, primjenom Hookeovog zakona, koji opisuje ovisnost promjene oblika čvrstog djela ovisno o djelovanju sile određen je Youngov modul elastičnosti. Youngov modul elastičnosti odgovara nagibu linearnog dijela, koji u ovom slučaju iznosi 229,7 MPa. Prekidna čvrstoća odgovara vrhu krivulje neposredno nakon linearne ovisnosti naprezanja o deformaciji. Vrijednost prekidne čvrstoće za uzorak 2H1 iznosi 7,503 MPa.

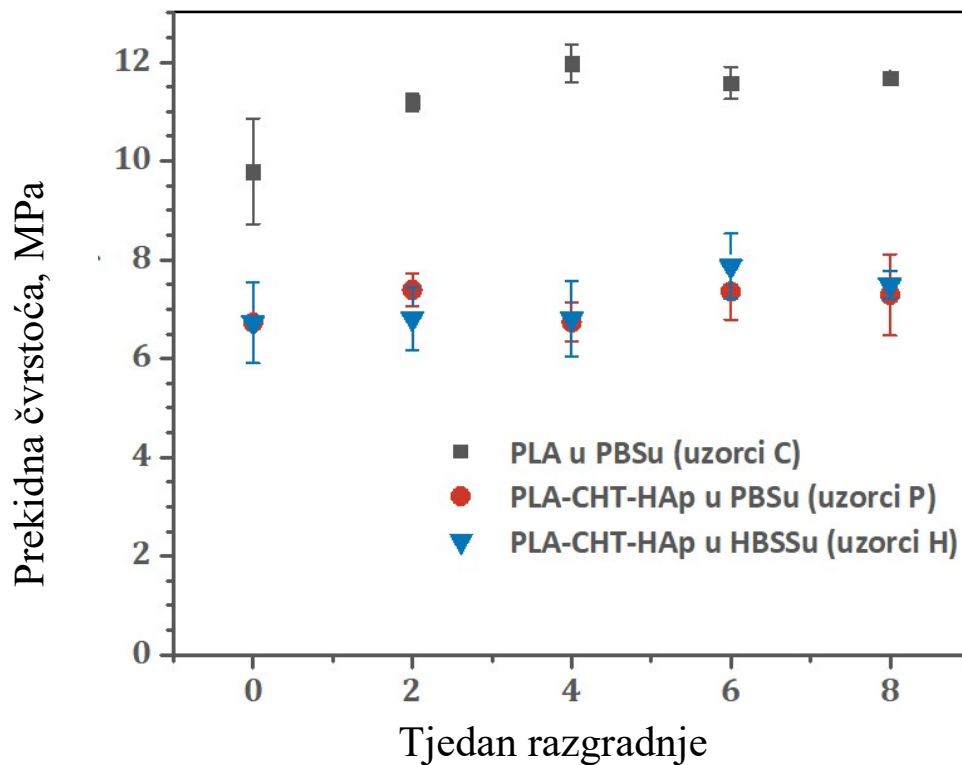
Tipična krivulja naprezanje – deformacija kompozitnih PLA-CHT-HAp nosača slojevite visokoporozne strukture osim klasične početne linearno-elastične regije, gdje za malu promjenu deformacije naglo raste potrebno naprezanje, sadrži i širi dio krivulje unutar kojeg su vidljive periodičke promjene. Nakon postizanje kritičnog iznosa naprezanja, pri kojem dolazi do prvog loma strukture, slijedi daljnje postepeno lomljenje trodimenzionalne slojevite strukture. Lokalni maksimumi u središnjem dijelu krivulje naprezanje – deformacija posljedica su urušavanju trodimenzionalne strukture sloj po sloj, sve dok ne dođe do završnog lomljenja čitavog poroznog nosača i stlačivanja u kompaktni materijal.



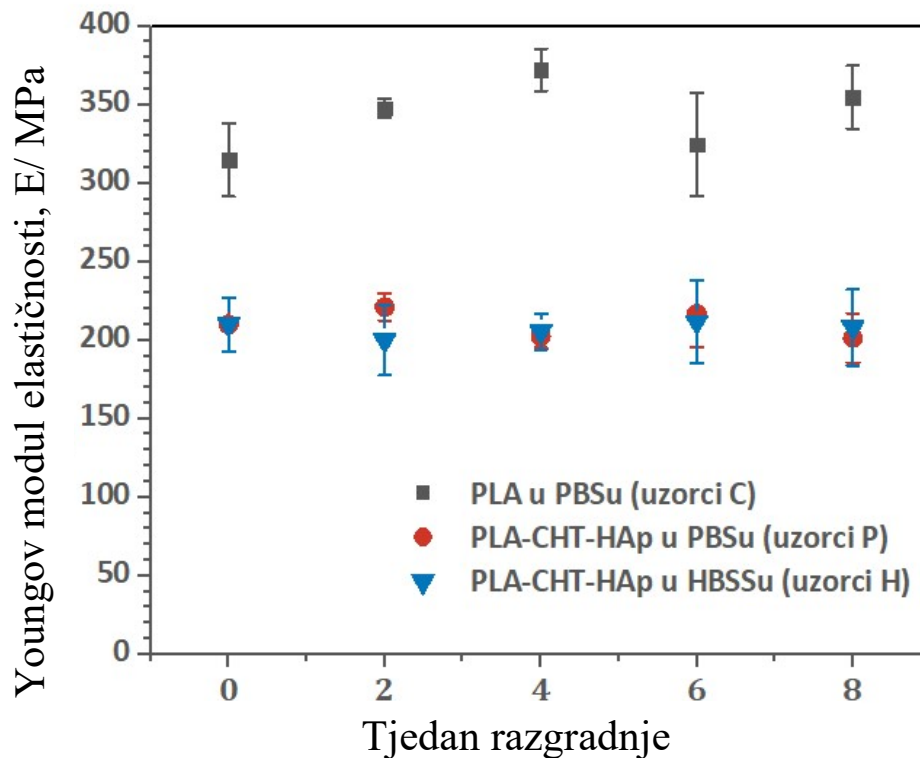
Slika 20. Dijagram naprezanje - deformacija za uzorak 2H1.

Grafički prikaz svih analiziranih krivulja nalazi se u prilogu (slika B1 – B14), dok su dok su vrijednosti za Youngov modul te prekidnu čvrstoću dani u tablicama A1 – A4 u prilogu.

Na slikama 20 i 21 prikazana je ovisnost prekidne čvrstoće, odnosno Youngovog modula elastičnosti o vremenu razgradnje.



Slika 21. Ovisnost prekidne čvrstoće o tjednu razgradnje.



Slika 22. Ovisnost Youngovog modula elastičnosti o tjednu razgradnje.

Youngov modul za uzorke *C*, kreće se od 300 MPa do 390 MPa, dok se vrijednosti za prekidnu čvrstoću kreću od 9,674 do 12,359 MPa. Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima Youngovog modula i prekidne čvrstoće za uzorke koji nisu podvrgnuti razgradnji (*0C*) moguće je zaključiti kako ne dolazi do značajnih promjena u mehaničkim svojstvima te da je porozni jednokomponentni nosač od PLA medicinske čistoće stabilan tijekom cijelog perioda razgradnje.

Također, analizirani su trokomponentni kompozitni uzorci koji nisu podvrgnuti razgradnji (nulti uzorci, *K*). Rezultati testa na tlačnu čvrstoću nultih uzoraka, prikazani su u tablici A2 u prilogu. Vrijednosti Youngovog modula nalaze se u intervalu od 190,7 MPa do 238,5 MPa, dok se vrijednosti za prekidnu čvrstoću kreću od 5,382 MPa do 7,556 MPa.

Usporedbom vrijednosti Youngovog modula i prekidne čvrstoće jednokomponentnih i trokomponentnih uzoraka koji nisu podvrgnuti razgradnji (*0C* i *K*) moguće je zaključiti kako kompozitni uzorci posjeduju slabija mehanička svojstva već nakon inicijalnog koraka pripreve u kojem je CHT-HAp hidrogel ugrađen u PLA nosač.

Rezultati za uzorke koji su razgrađivani u PBS-u (u prisustvu enzima lizozima, *P*) prikazani su u tablici A3 u prilogu, dok su rezultati za uzorke koji su razgrađivani u HBSS-u (bez prisustva enzima lizozima) prikazani u tablici A4 u prilogu. Youngov modul za uzorke *P* poprima vrijednosti od 182,3 MPa do 245,2 MPa, dok se vrijednosti za prekidnu čvrstoću kreću od 6,204 MPa do 8,499 MPa. Uzorci razgrađivani u HBSS-u (*H*) imaju vrijednosti Youngovog modula od 176,1 MPa do 240,5 MPa, a vrijednosti za prekidnu čvrstoću nalaze se u intervalu od 5,930 MPa do 8,477 MPa.

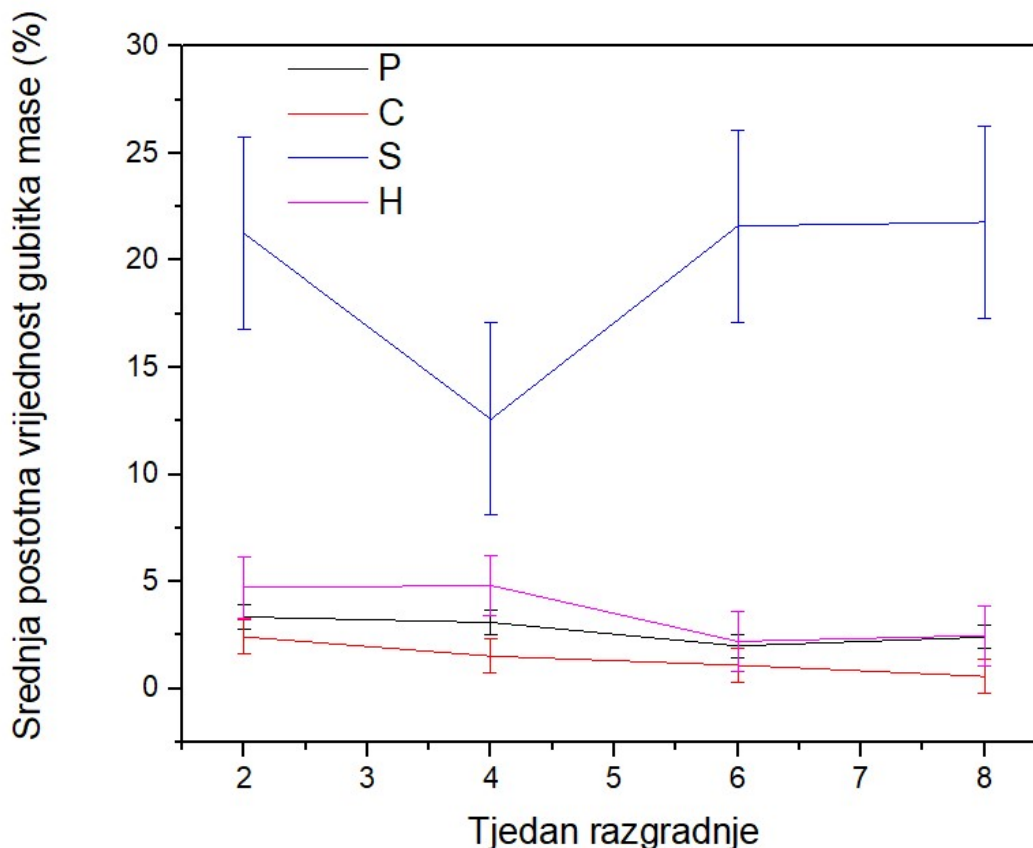
Usporedbom dobivenih vrijednosti analiziranih uzoraka H i P , očito je kako su vrijednosti Youngovog modula te prekidne čvrstoće vrlo slične, stoga je moguće zaključiti kako dodatak enzima u koncentraciji većoj od biološke nema utjecaja na brzinu razgradnje nosača. Može se pretpostaviti kako pri ispitivanim uvjetima i unutar ispitivanog perioda hidrolitičke razgradnje dodatak enzima nema značajan utjecaj na mehanička svojstva PLA, glavnog nosioca mehaničkih svojstava ispitivanih kompozitnih uzoraka.

Nadalje, dobivene vrijednosti Youngovog modula elastičnosti i prekidne čvrstoće uzoraka K , H i P sličnih su vrijednosti, što ukazuje da prilikom pripreve kompozitnih uzoraka dolazi do momentalnog smanjenja mehaničkih svojstava koja se potom zadržavaju tijekom cijelog perioda razgradnje.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako tijekom razgradnje nije došlo do značajnih promjena u mehaničkim svojstvima svih ispitivanih uzoraka. Naime, vrijednosti Youngovog modula elastičnosti te prekidne čvrstoće nakon razgradnje slični su onima prije razgradnje, što upućuje na zadržavanje ispitanih mehaničkih svojstava pripremljenih uzoraka u uvjetima razgradnje. Iz dobivenih je vrijednosti Youngovog modula očito kako trofazni kompozitni uzorci imaju manju otpornost na deformaciju pod utjecajem vanjske sile te isto tako pokazuju manju čvrstoću od uzoraka pripremljenih isključivo od PLA. Potrebna su daljnja detaljnija istraživanja svojstava korištenih polimernih materijala tijekom pripreve i razgradnje, poput određivanja stupnja kristalnosti i molekulske mase polimera, kako bi se utvrdilo dolazi li do degradacije, to jest u kojoj mjeri i na koji način.

4.2. PROMJENA MASE UZORAKA

Tijekom eksperimenta, također je praćena promjena mase uzoraka prije i nakon hidrolitičke razgradnje. Dobiveni rezultati grafički su prikazani na slici 23.



Slika 23. Ovisnost srednje postotne vrijednosti gubitka mase o tjednu razgradnje.

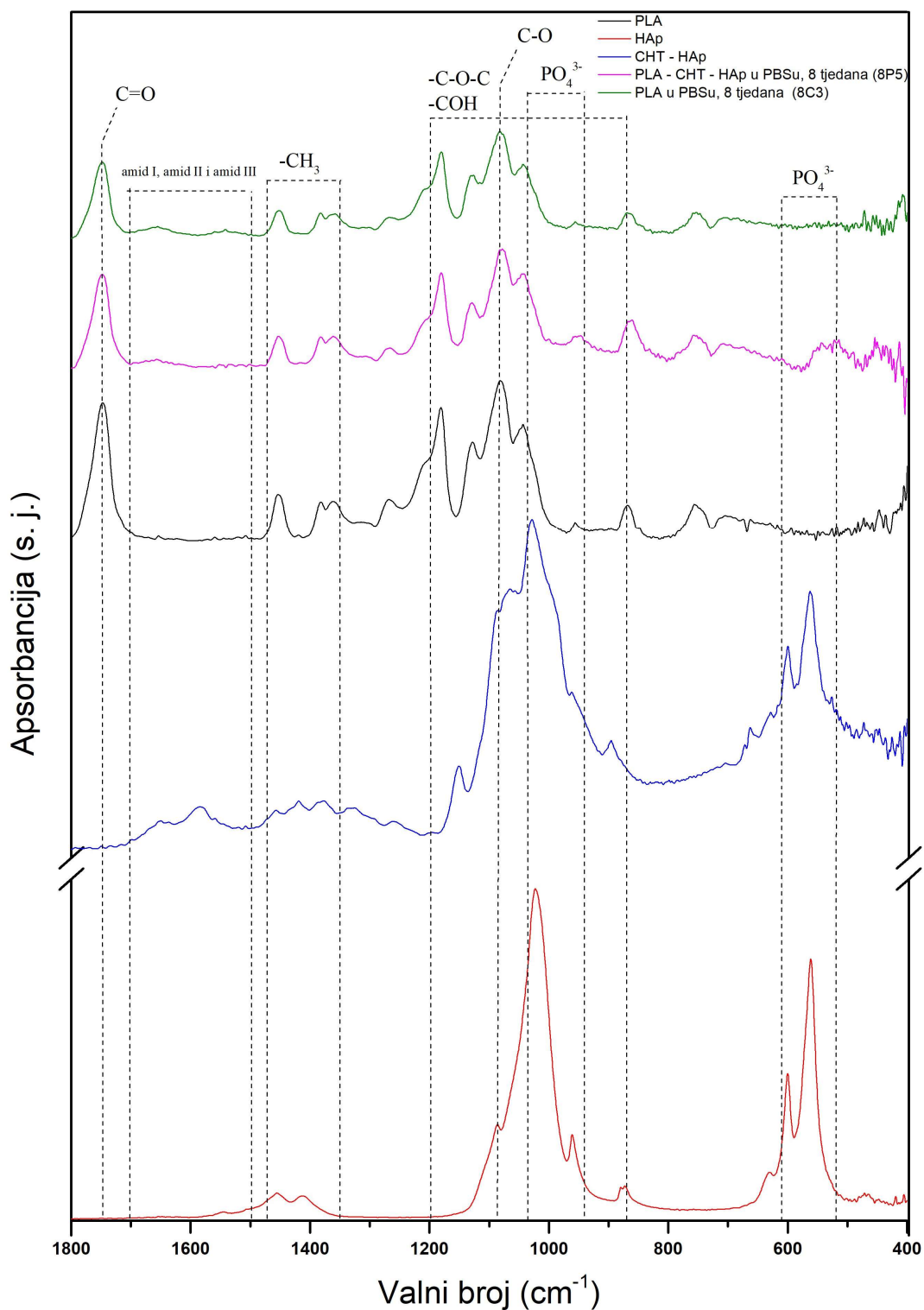
Iz priloženog grafičkog prikaza moguće je zaključiti kako uzorci trokomponentnog faznog sustava (PLA – CHT – HAp) razgrađivani u PBS-u i u HBSS-u nakon početnog gubitka u drugom tjednu zadržavaju masu ili pokazuju blagu tendenciju dobivanja mase. Razlog blagog povećanja mase uzoraka moguće je povezati s taloženjem anorganskih soli iz pufera, koji je kontinuirano zamjenjivan. Iz grafičkog je prikaza također vidljivo kako uzorci *C* zadržavaju masu i pokazuju slično ponašanje kao i *P* i *H* uzorci. Vrijednosti postotnog gubitka mase za uzorke *S* pokazuju značajniji inicijalni gubitak mase, no u daljnjim tjednima pokazuju veliku devijaciju vrijednosti, stoga nije moguće komentirati dobivene rezultate.

4.3. VIBRACIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Identifikacija pripremljenih sustava infracrvenom spektroskopijom prikazana je na slici 24. Hidroksiapatit, kao referentni uzorak, posjeduje apsorpcijske vrpce karakteristične za fosfatnu skupinu: vrpca pri 1026 cm^{-1} pripada asimetričnom, dok vrpca na 962 cm^{-1} odgovara simetričnom istezanju PO_4^{3-} veze. Vrpce na 604 i 561 cm^{-1} pripisuju se asimetričnom savijanju PO_4^{3-} veze.

Nadalje, prikazan je i spektar CHT – HAp na kojem su vidljive karakteristične apsorpcijske vrpce kitozana. Asimetrično rastezanje C-O-C pojavljuje se na 1150 cm^{-1} , dok su u rasponu od 1060 do 1020 cm^{-1} prisutne –CO vibracije istezanja u –COH skupini. Nadalje, kitozan posjeduje i apsorpcijske vrpce na 1650 te 1570 cm^{-1} koje su dodijeljene amidu I (vibracije rastezanja C=O uz rastezanje C-N i savijanje N-H u amidnoj funkcionalnoj skupini), amidu II (istezanje C-N vibracije u kombinaciji s N-H savijanjem) te amidu III (N-H savijanje s C-N rastezanjem, te C-H i N-H deformacijske vibracije). Isto tako, radi prisustva –OH i –NH₂, kitozan posjeduje vrpce u rasponu od 3000 do 3600 cm^{-1} , no one nisu prikazane u dobivenom spektru radi izrazito slabog intenziteta [40].

Naposlijetku, kao referentni PLA uzorak, korištena je ekstrudirana PLA medicinske čistoće. Apsorpcijska vrpca pri 1746 cm^{-1} pripisuje se simetričnom istezanju C=O veze, vrpca pri 1080 cm^{-1} odgovara istezanju C-O veze, dok se vrpce prisutne u rasponu od 1452 do 1361 cm^{-1} pripisuju asimetričnom, odnosno simetričnom savijanju –CH₃ veze [41].

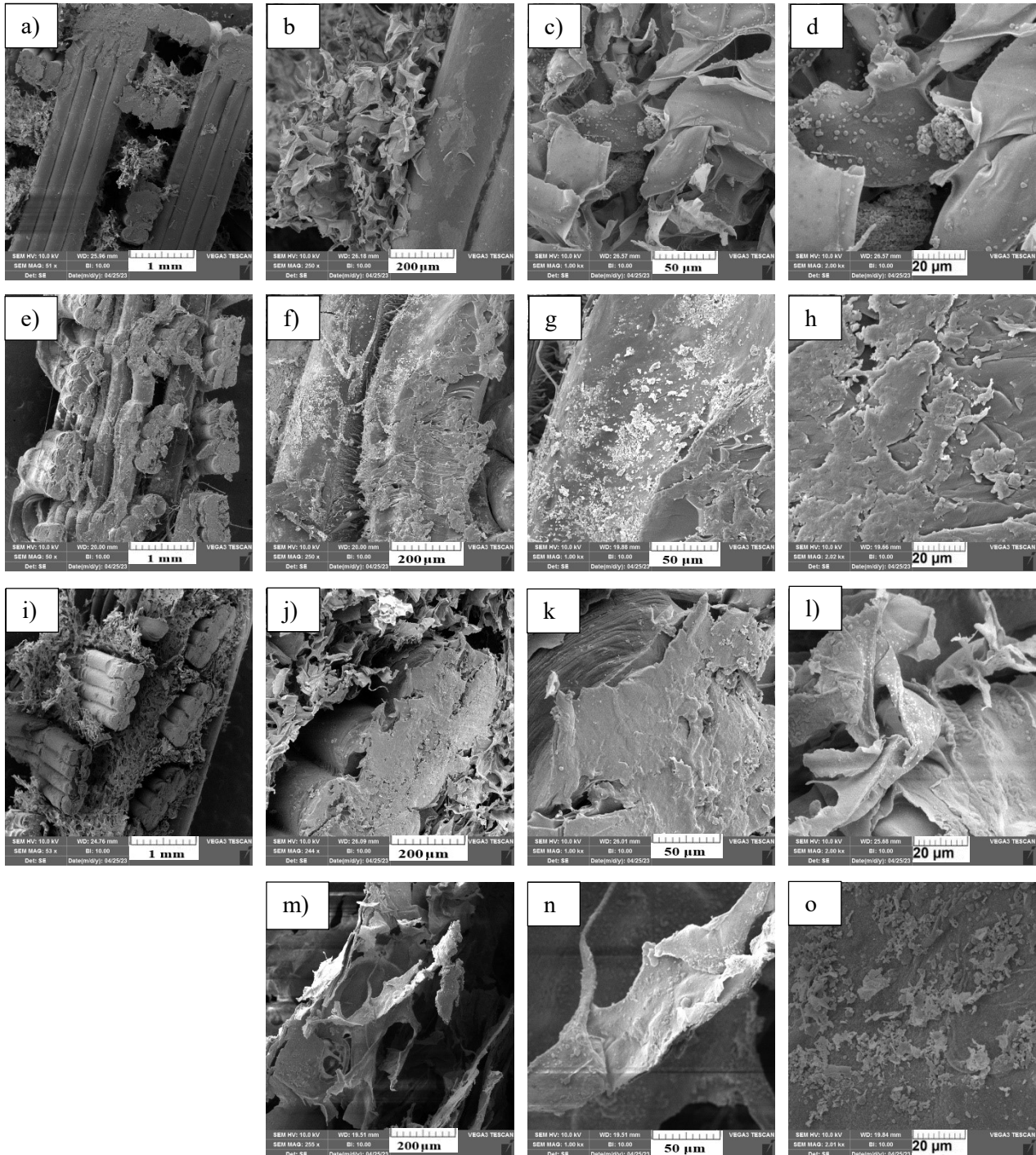


Slika 24. FTIR spektri referentnih uzoraka (HAp, PLA i CHT-HAp) te analiziranih kompozitnih uzoraka (8P5 i 8C3).

U spektrima snimljenih uzoraka (8P5 i 8C3) nisu uočene veće promjene u odnosu na FTIR spektre referentnih uzoraka. Vidljivo je smanjenje intenziteta vrpce karakterističnih za fosfatne skupine hidroksiapatita, što se može objasniti razgradnjom ili reprecipitacijom istog. Karakteristične vrpce PLA ostale su postojane tijekom svih osam tjedana razgradnje, što ukazuje na postojanost strukture poli(mliječne kiseline).

4.4. ANALIZA MIKROSTRUKTURE

Na slici 25. prikazane su mikrografije ispitivanih uzoraka prije razgradnje (a – d) i nakon provedbe mehaničkih ispitivanja tijekom osam tjedana razgradnje (e – o).



Slika 25. SEM mikrografije uzorka nakon provedbe ispitivanja mehaničkih svojstava tlačnim opterećenjem prikazuju kontrolni PLA-CHT-HAP (*K7*) (a – d), PLA nosač nakon 8 tjedana razgradnje u PBS-u (*8C3*) (e – h), PLA-CHT-HAP uzorak nakon 8 tjedana razgradnje u PBS-u (*8P1*) (i – l) te uzorak CHT-HAP nakon 8 tjedana razgradnje u PBS-u (*8S1*) (m – o).

SEM mikrografije na slikama 25 a) – d) prikazuju trofazne kompozitne uzorke koji nisu bili podvrgnuti razgradnji (uzorci **K**). Iz priloženih mikrografija moguće je uočiti „cjevastu“ strukturu PLA dobivenu 3D ispisom. Unutar trodimenzionalnog PLA skeleta vidljiva je visokoporozna spužvasto-lističasta struktura kitozana, na čijoj su površini pri većim uvećanjima (25 c i d) vidljive nehomogeno raspodijeljene nakupine mikrometarskih dimenzija koje se pripisuju aglomeratima hidroksiapatita.

Mikrografije označene od e) do h) pripadaju jednodimenzionalnom poroznom nosaču od PLA medicinske čistoće (uzorak **C**) nakon primjene tlačnog opterećenja. Pri uvećanju od 50× (25 e) vidljivo je smanjenje poroznosti i kolaps trodimenzionalnog PLA skeleta po osi paralelnoj na pravac primjene tlačnog opterećenja. Mikrografije 25 f - h pokazuju način savijanja strukture pri većem povećanju. Pojava tanke površinske nakupine (25 g) jest posljedica sušenja nosača nakon provedbe tlačnog opterećenja. Naime, i uzorci od referentnog nultog tjedna stavljeni su u puferski medij na tri sata, kako bi ispitivanja na svim uzorcima bila provedena u nabubrenom stanju.

Mikrografije označene od i) do l) pripadaju trokomponentnom nosaču (PLA-CHT-HAp) razgrađivanom u PBS-u, tijekom 8 tjedana, nakon primjene tlačnog napreznja (uzorak **8P3**). Na mikrografijama nije vidljiva znatna promjena u strukturi u odnosu na uzorke koji nisu podvrgnuti razgradnji (25 a – d). Pri uvećanju od 2000× (25 l) vidljiv je talog koji se može pripisati taloženju anorganskih soli iz pufera, radi kojeg dolazi do blagog porasta u masi uzorka tijekom razgradnje. Nadalje, na priloženim mikrografijama nije uočeno stanjivanje kitozanske strukture niti pojava poroznosti na PLA skeletu.

Mikrografije uzoraka CHT-HAp (m - o), nakon osam tjedana razgradnje u PBS-u (**8S1**), također ne pokazuju znatne razlike u strukturi kitozana. No, može se uočiti (n – o) veći udio taloga na površini, koji se može pripisati istaloženim anorganskim solima iz pufera. Talog, kao što je i prije spomenuto, uzrokuje tendenciju rasta mase tijekom razgradnje.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog završnog rada bio je provesti hidrolitičku razgradnju pripremljenih nosača na temelju poli(mliječne kiseline). Kako bi se poboljšala bioaktivnost pripremljenih potencijalnih koštanih nosača, nužna je modifikacija čiste poli(mliječne kiseline) dodatkom kitozana i hidroksiapatita.

Kompozitni PLA-CHT-HAp uzorci dobiveni su kombinacijom tehnike 3D ispisa i ugradnje CHT-HAp hidrogela. Kitozan-hidroksiapatini (CHT-HAp) gel ugrađen je unutar PLA. U eksperimentalnom dijelu ovog rada tijekom osam tjedana praćena je razgradnja kompozitnih PLA-CHT-HAp materijala u mediju koji simulira fiziološki sastav. Sistematski je praćena promjena mehaničkih i strukturnih svojstava nosača.

Iz dobivenih rezultata identifikacije i mehaničke karakterizacije pripremljenih materijala moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- ✓ Analizom dobivenih rezultata testa na tlačnu čvrstoću ustanovljeno je kako kompozitni materijali zbog procesa pripreme kompozita posjeduju slabija mehanička svojstva u odnosu na čistu poli(mliječnu kiselinu)
- ✓ Provedbom mehaničke karakterizacije testom na tlačnu čvrstoću utvrđeno je kako su svi pripremljeni uzorci, nakon inicijalnog smanjenja mehaničkih svojstava, održali mehaničku stabilnost tijekom cijelog perioda razgradnje, što ih čini prikladnima za dugoročno liječenje koštanih defekata
- ✓ Vibracijskom spektroskopijom nisu zapažene značajne promjene u kemijskoj strukturi pripremljenih nosača
- ✓ Analizom mikrostrukture, uočeno je kako je tijekom eksperimenta došlo do taloženja anorganskih soli iz pufera, čime se objašnjava neočekivani blagi porast mase kompozitnih materijala tijekom procesa razgradnje

Zaključno, potrebna su daljnja istraživanja svojstva pripremljenih materijala, kako bi se utvrdilo dolazi li do degradacije istih. Isto tako, potrebno je provesti biološka ispitivanja kako bi se analizirao biološki odgovor matičnih stanica na prisutnost kompozitnih nosača.

6. POPIS SKRAĆENICA I SIMBOLA

PLA – poli(mliječna kiselina)

PP – polipropilen

PUR – poliuretani

PET – poli(etilen-tereftalat)

PVC – poli(vinil-klorid)

PS – polistiren

HDPE – polietilen visoke gustoće (engl. *High-density polyethylene*)

LDPE – polietilen niske gustoće (engl. *Low-density polyethylene*)

PC – polikarbonat

PLLA – poli-L-mliječna kiselina

PDLA – poli-D-mliječna kiselina

PDLLA – poli-D,L-mliječne kiselina

T_m – temperatura taljenja (engl. *Melting temperature*)

T_g – temperatura staklastog prijelaza (engl. *Glass Transition temperature*)

σ – vlačno naprezanje

E – Youngov modul elastičnosti

ε – krajnje naprezanje

σ^* - specifično vlačno naprezanje

E^* - specifičan vlačni modul

PCL – polikaprolakton

HAp – hidroksiapatit

CHT – kitozan

SFF – tehnike slobodnog oblikovanja čvrste tvari (engl. *Solid freeform fabrication*)

FDM – modeliranje taloženjem spojenih slojeva (engl. *Fused deposition modeling*)

PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)

HBSS – Hankova uravnotežena solna otopina (engl. *Hanks' balanced salt solution*)

FTIR – infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*)

SEM – pretražna elektronska mikroskopija (engl. *Scanning electron microscopy*)

7. LITERATURA

- [1] Janović, Z., Polimerizacija i polimeri, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb, 1997., str. 1-6.
- [2] Rustgi R., Chandra R., Biodegradable Polymers, *Prog. Polym. Sci.* **23** (1998) 1273-1335
- [3] Qi X., Ren Y., Wang X., New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid, *Int. Biodeterior. Biodegradation* **117** (2017) 215-223
- [4] <https://www.slideshare.net/ssuser3f6a84/hydrolytic-degradation-28608086> (pristup 4. srpnja 2023.)
- [5] Geyer R., Production, use, and fate of synthetic polymers, u: Letcher M. T., *Plastic Waste and Recycling Environmental Impact, Societal Issues, Prevention, and Solutions*, Cambridge, Academic Press **2** (2020) 13-32.
- [6] Ashter A. S., *Introduction to Bioplastics Engineering*, Merrimack, William Andrew, 2016., str. 1-17.
- [7] Siddhi S. P., Dilip V. V., Biodegradable Polymeric Materials: Synthetic Approach, *ACS Omega* **5** (2020) 4370-4379.
- [8] Gupta B., Revagade N., Hilborn J., Poly(lactic acid) fiber: An overview, *Prog. Polym. Sci.* **32** (2007) 455-482.
- [9] Kovacic P. J., Lactic Acidosis, u: Silverstein D. C., Hopper K., *Small Animal Critical Care Medicine*, Philadelphia, Saunders **60** (2009) 254-257.
- [10] Komesu, A., Oliveira, J. A. R. d., Martins, L. H. d. S., Wolf Maciel, M. R., Maciel Filho, R., Lactic acid production to purification: A review, *BioResources* **12** (2017) 4364-4383.
- [11] Wee, Y. J., Kim J.-N., Ryu H.-W., Biotechnological Production of Lactic Acid, *Food Technol. Biotechnol.* **44** (2006) 163-172.
- [12] Garlotta D., A Literature Review of Poly(Lactic Acid), *J. Polym. Environ.* **9** (2002) 63-84.
- [13] Castro-Aguirre E., Iniguez-Franco F., Samsuding H., Fang X., Auras R., Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **107** (2016) 333-366.
- [14] [https://hr.chinabiomaterial.com/poly\(lactic-acid\)/pla-granule/corn-to-poly\(lactic-acid\).html](https://hr.chinabiomaterial.com/poly(lactic-acid)/pla-granule/corn-to-poly(lactic-acid).html) (pristup 18. srpnja 2023.)

- [15] Farah S., Anderson G. D., Langer R., Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review, *Adv. Drug Deliev. Rev.* **107** (2016) 367-392.
- [16] Chan M. C., Vandi L. J., Pratt S., Halley P., Richardson D., Werker A, Laycock B., Composites of Wood and Biodegradable Thermoplastics: A Review, *u: Polymer Reviews*, **58** (2017) 444-494.
- [17] <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/polymers/spherulites.php> (pristup 10. srpnja 2023.)
- [18] Ranakoti L., Gangil B., Mishra K. S., Singh T., Sharma S., Ilyas R. A., El-Khatib S., Critical Review on Polylactic Acid: Properties, Structure, Processing, Biocomposites, and Nanocomposites, *Materials* **15** (2022) 4312.
- [19] Shrivastava A., Introduction to Plastics Engineering, William Andrew, Norwich, 2016., str. 1-17.
- [20] Ebrahimi F., Dana R. H., Poly lactic acid (PLA) polymers: from properties to biomedical applications, *u: Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, Milton Park, Taylor & Francis (2021) 1-14.
- [21] Callister W. D., Rethwisch D. G., Fundamentals of Materials Science and Engineering: An Integrated Approach, 5th Edition, New York City, 2016., str. 523.
- [22] De Stefano V., Khan S., Tabada A., Applications of PLA in modern medicine, *Eng. Regen.* **1** (2020) 76–87.
- [23] Zaaba N. F., Jaanfar M., A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation, *u: Polym Eng Sci.* (2020) 1-15.
- [24] Vert M., Doi Y., Hellwisch K. H., Hess M., Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schué F., Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure Appl. Chem* **84** (2012) 377-410.
- [25] Singhvi M. S., Zinjarde S. S., Gokhale D. V., Polylactic acid: synthesis and biomedical applications, *J. Appl. Microbiol.* **18** (2019) 101094.
- [26] Zaman S. U., Irfan M, Irfan M, Muhammad N, Zaman MKU, Rahim A, Rehman SU. Overview of hydroxyapatite; composition, structure, synthesis methods and its biomedical uses, *Biomed. Lett.* **6** (2020) 84-99.
- [27] Rujitanapanich S., Kumpapan P., Wanjanoi P., Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation, *Energy Procedia* **56** (2014) 112-117.

- [28] Khalid H., Chaudry A. A., Basics of hydroxyapatite structure, synthesis, properties, and clinical applications, u: Chaudry A. A., Khan A. S., Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites, Sawston, Woodhead Publ. **4** (2020) 85-115.
- [29] Osuchukwu O. A., Salihi A., Aabdullahi I., Abdulkareem B., Nwannenna C. S., Synthesis techniques, characterization and mechanical properties of natural derived hydroxyapatite scaffolds for bone implants: a review, u: SN Applied Sciences (2021) 1-23.
- [30] Bauer L., Priprava visokoporoznog biorazgradivoga i biokompatibilnoga materijala na temelju supstituiranog hidroksiapatita, doktorska disertacija (2021), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. str. 14.
- [31] V.-R. Maria, D. Acros, Biological apatites in bone and teeth, u Biomim. Nanoceramics Clin. Use From Mater. to Appl., R. Soc. Chem., Cambridge, 2008, str. 1–24.
- [32] K. Lin, J. Chang, Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications, u: Mucalo M., Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications, Sawston, Woodhead Publ. **1** (2015) 3-19.
- [33] Rinaudo M., Chitin and chitosan: Properties and applications, Prog. Polym. Sci. **31** (2006) 603-632.
- [34] Zicola J., Functional analysis of Ecp6: The LysM effector from the tomato pathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (2016) str 13.
- [35] Ibrahim H. M., El-Zairy E. M. R., Chitosan as a Biomaterial - Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers, u: Bobbarala V., Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials **4** (2015) 81-101.
- [36] Zagho M. M., Hussein E. A., Elzathry A., Recent Overviews in Functional Polymer Composites for Biomedical Applications, Polymers **10** (2018) 739.
- [37] Nazeer M. A., Onder O. C., Sevgili I., Yilgor E., Kavakli I. H., Yilgor I., 3D printed poly(lactic acid) scaffolds modified with chitosan and hydroxyapatite for bone repair applications, Mater. Today Commun. **25** (2020) 101515.
- [38] Junjie X., Fourier Transform Infrared Spectroscopy Instrumentation and Integration with Thermogravimetry, Masters Thesis & Specialist Projects (2018) 4-11.
- [39] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., Fundamentals of Analytical Chemistry, Cengage Learning, Boston, 2013., str. 713-715.
- [40] Rogina A., *In situ* sinteza hidroksiapatita u matrici biorazgradivih polimera doktorska disertacija (2015), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, str. 38.

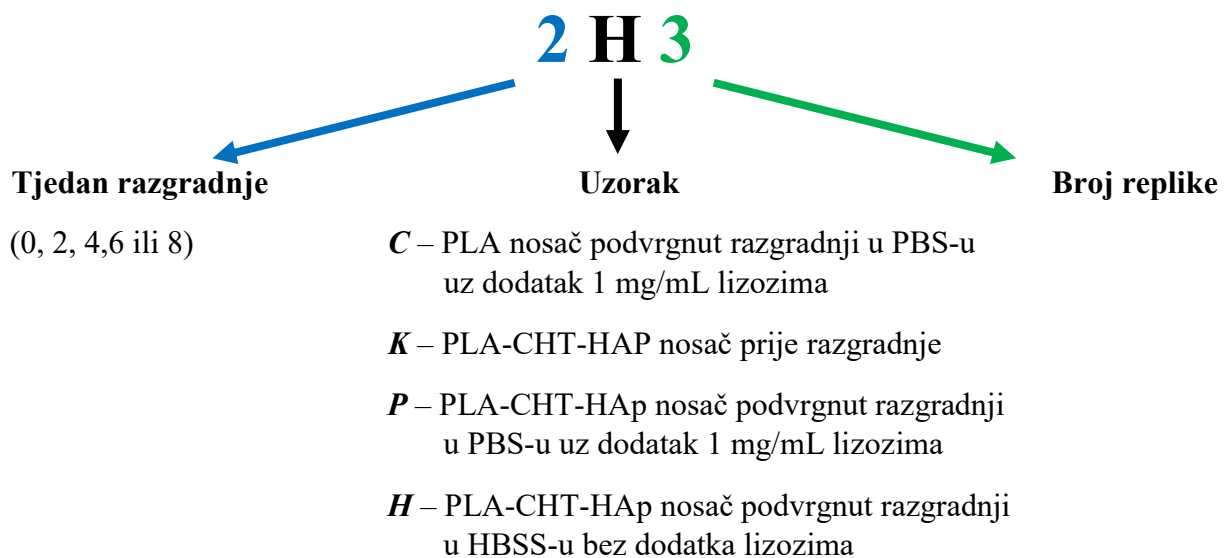
[41] Buon W. C., Nor A. I., Wan Md Z. W Y., Mohd Z. H., Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets, *Polymers* **6** (2014) 93-104.

8. PRILOG

Detaljni rezultati karakterizacije mehaničkih svojstava pri tlačnom opterećenju prije i tijekom 2, 4, 6 i 8 tjedana hidrolitičke degradacije za sve testirane uzorke dani su u:

Prilog A) Tablične vrijednosti karakterizacije mehaničkih svojstava
Prilog B) Grafički prikaz krivulja naprezanje - deformacija

Replike uzoraka označavane su na sljedeći način:



Dimenzije uzoraka te vrijednosti Youngovog modula elastičnosti i prekidne čvrstoće za kontrolne nosače pripravljene isključivo od PLA (oznaka **C**) prikazane su u tablici A1, dok su pripadajuće krivulje sila – naprezanje prikazane na slikama B1-B4 (nakon 2, 4, 6, odnosno 8 tjedana razgradnje).

Dimenzije uzoraka te vrijednosti Youngovog modula elastičnosti i prekidne čvrstoće za nulte uzorke, trokomponentne kompozitne uzorke PLA-CHT-HAP prije razgradnje (oznaka **K**), prikazane su u tablici A2, dok su pripadajuće krivulje sila – naprezanje svih replika prikazane na slikama B5-B6.

Rezultati mehaničkih ispitivanja za kompozitne uzorke PLA-CHT-HAP tijekom hidrolitičke razgradnje u PBS-u uz dodatak enzima prikazani su u tablici A3 i na slikama B7-B11 (nakon 2, 4, 6, odnosno 8 tjedana razgradnje).

Rezultati mehaničkih ispitivanja za kompozitne uzorke PLA-CHT-HAP tijekom hidrolitičke razgradnje u HBSS-u uz bez dodatka enzima prikazani su u tablici A4 i na slikama B11-B14 (nakon 2, 4, 6, odnosno 8 tjedana razgradnje).

8.1. Prilog A. Tablične vrijednosti karakterizacije mehaničkih svojstava

Tablica A1. Dimenzije uzoraka i rezultati testa na tlačnu čvrstoću za kontrolne 3D printane PLA nosače (C).

Uzorak	Visina / mm	a / mm	b / mm	E / MPa	σ_M / MPa
0C1	10,10	10,31	10,33	321,3	9,674
0C2	10,10	10,30	10,30	288,8	8,778
0C3	9,99	10,35	10,38	334,1	10,917
2C1	9,99	10,35	10,38	352,1	11,262
2C2	10,03	10,30	10,32	343,8	10,985
2C3	10,18	10,26	10,42	309,7*	11,326
4C1	10,08	10,10	10,08	385,3	12,359
4C2	10,11	10,36	10,28	358,6	11,969
4C3	10,06	10,38	10,38	372,7	11,586
6C1	10,04	10,31	10,35	362,2	11,960
6C2	10,15	10,31	10,41	302,1	11,433
6C3	10,10	10,39	10,36	309,6	11,360
8C1	10,01	10,36	10,41	368,9	11,633
8C2	10,09	10,31	10,38	340,5	11,724
8C3	10,22	10,32	10,36	146,6*	11,675

* vrijednost odbačena prilikom računanja srednje vrijednosti i varijance za grafički prikaz

Tablica A2. Dimenzije uzoraka i rezultati testa na tlačnu čvrstoću za kompozitne PLA-CHT-HAp uzorke (K) koji nisu podvrgnuti razgradnji.

Uzorak	Visina /mm	a / mm	b / mm	E / MPa	σ_M / MPa
0K1	10,00	10,33	10,39	214,0	6,599
0K2	10,08	10,34	10,34	204,3	7,312
0K3	10,00	10,31	10,35	216,9	7,072
0K4	10,11	10,32	10,41	196,4	5,382
0K5	10,14	10,26	10,42	190,7	5,875
0K6	10,12	10,26	10,31	109,8*	7,556
0K7	10,00	10,36	10,36	238,5	7,278

* vrijednost odbačena prilikom računanja srednje vrijednosti i varijance za grafički prikaz

Tablica A3. Dimenzije uzoraka i rezultati testa na tlačnu čvrstoću za kompozitne PLA-CHT-HAP uzorke razgrađivane u PBS-u u prisustvu lizozima (*P*).

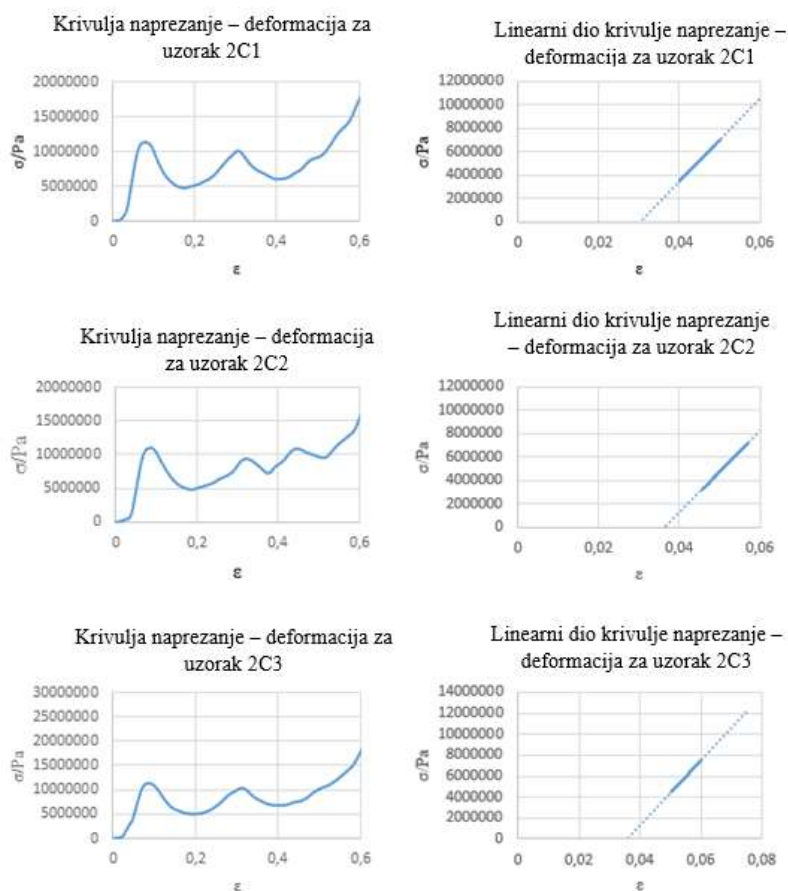
Uzorak	Visina / mm	<i>a</i> / mm	<i>b</i> / mm	<i>E</i> / MPa	σ_M / MPa
2P1	10,10	10,33	10,36	225,8	7,499
2P2	10,09	10,36	10,41	218,4	7,429
2P3	10,11	10,38	10,33	217,7	7,690
2P4	10,07	10,43	10,34	210,9	7,491
2P5	10,03	10,40	10,40	233,1	6,834
4P1	10,27	10,40	10,45	197,9	6,810
4P2	10,10	10,38	10,30	198,9	6,363
4P3	10,08	10,26	10,38	245,3*	7,305
4P4	10,25	10,38	10,35	159,8*	6,346
4P5	10,08	10,42	10,44	210,4	6,825
6P1	10,03	10,46	10,30	216,9	7,871
6P2	10,04	10,37	10,46	196,4	6,593
6P3	10,04	10,41	10,38	196,3	6,936
6P4	10,03	10,31	10,36	228,7	7,832
6P5	10,07	10,45	10,33	245,2	7,539
8P1	10,09	10,30	10,38	208,5	6,204
8P2	10,12	10,38	10,42	187,1	8,499
8P3	10,04	10,45	10,37	215,4	7,388
8P4	10,18	10,35	10,31	182,3	7,037
8P5	10,03	10,41	10,38	213,5	7,312

* vrijednost odbačena prilikom računanja srednje vrijednosti i varijance za grafički prikaz

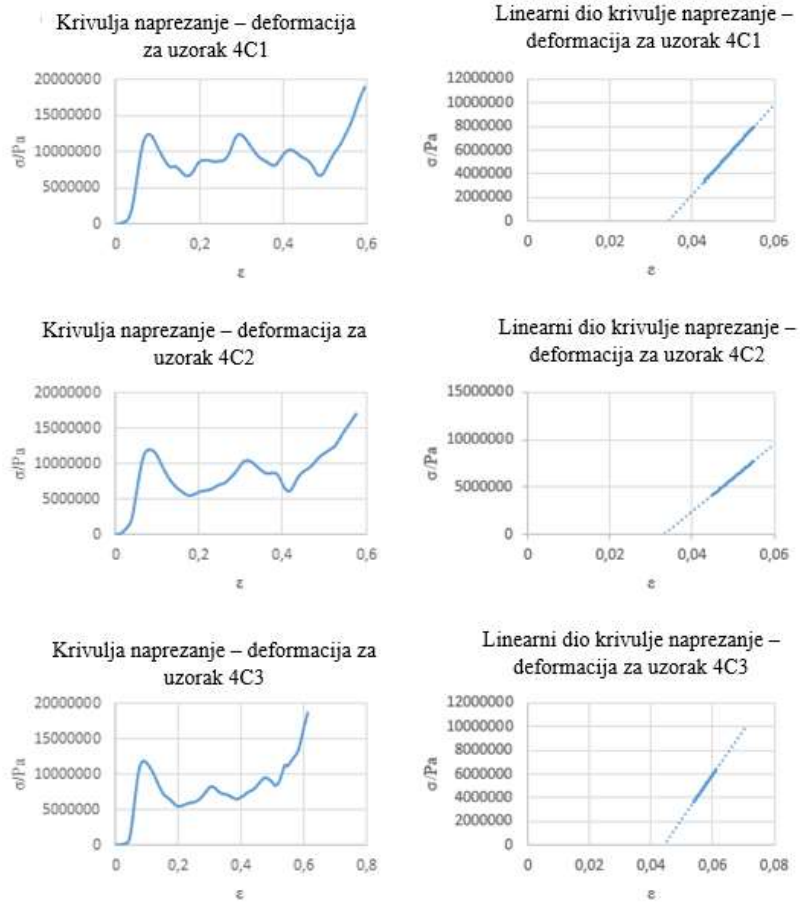
Tablica A4. Dimenzije uzoraka i rezultati testa na tlačnu čvrstoću za kompozitne PLA-CHT-HAP uzorke razgrađivane u HBSS-u u odsustvu lizozima (*H*).

Uzorak	Visina / mm	<i>a</i> / mm	<i>b</i> / mm	<i>E</i> / MPa	σ_M / MPa
2H1	10,10	10,42	10,36	229,7	7,503
2H2	10,20	10,32	10,48	191,0	5,930
2H3	10,12	10,41	10,38	178,5	6,400
2H4	10,08	10,37	10,44	216,4	7,168
2H5	10,05	10,39	10,34	183,2	7,015
4H1	10,08	10,42	10,44	202,4	7,113
4H2	10,06	10,33	10,32	195,6	6,041
4H3	10,11	10,38	10,40	207,6	7,061
4H4	10,08	10,42	10,38	197,2	6,028
4H5	10,07	10,31	10,38	224,0	7,791
6H1	10,20	10,31	10,39	203,7	8,477
6H2	10,07	10,41	10,32	256,7	8,241
6H3	10,03	10,31	10,36	194,8	7,979
6H4	10,08	10,39	10,43	210,1	7,886
6H5	10,08	10,35	10,43	193,0	6,753
8H1	10,05	10,31	10,37	176,1	7,271
8H2	10,03	10,28	10,38	240,5	7,836
8H3	10,00	10,38	10,32	196,9	7,485
8H4	10,18	10,28	10,33	220,8	7,697
8H5	10,05	10,26	10,31	206,0	7,157

8.2. Prilog B. Grafički prikaz krivulja naprezanje – deformacija



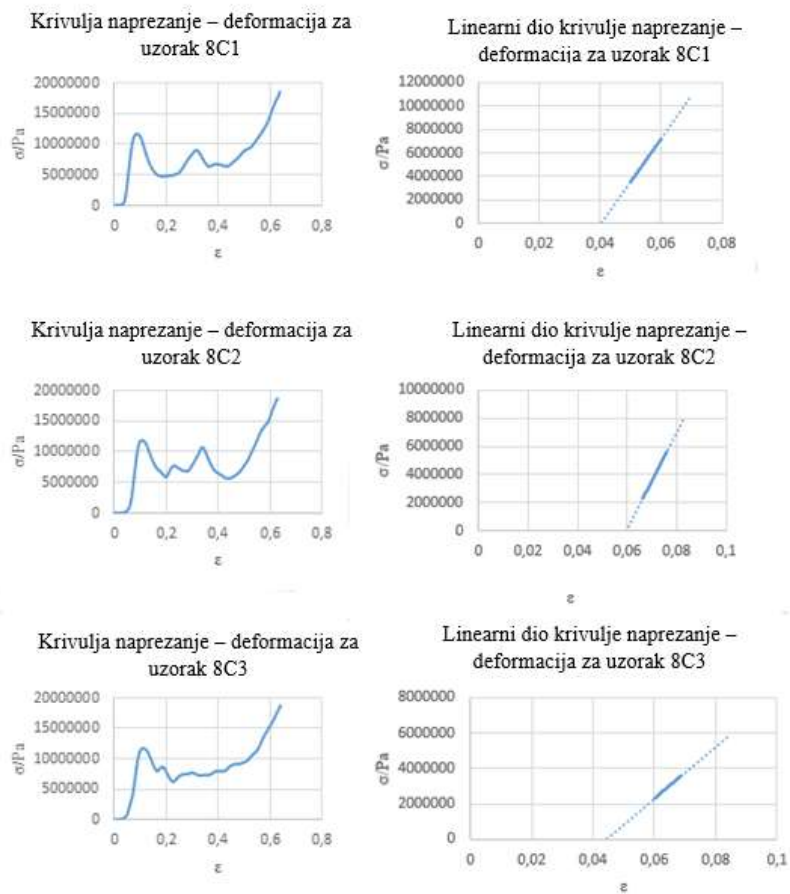
Slika B26. Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak C u drugom tjednu razgradnje.



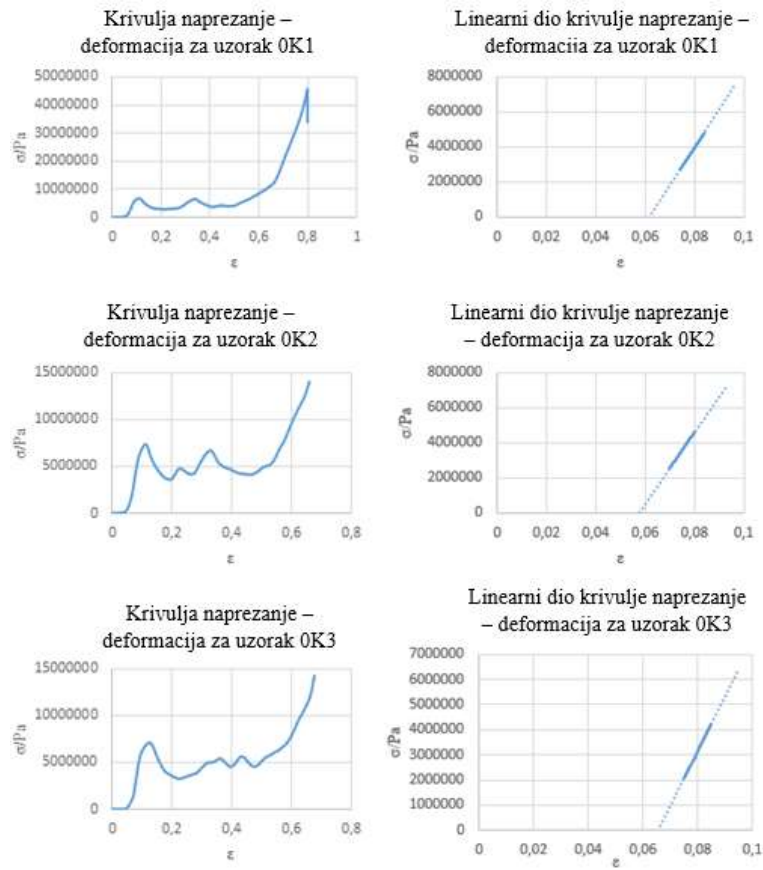
Slika B27. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak C u četvrtom tjednu razgradnje.



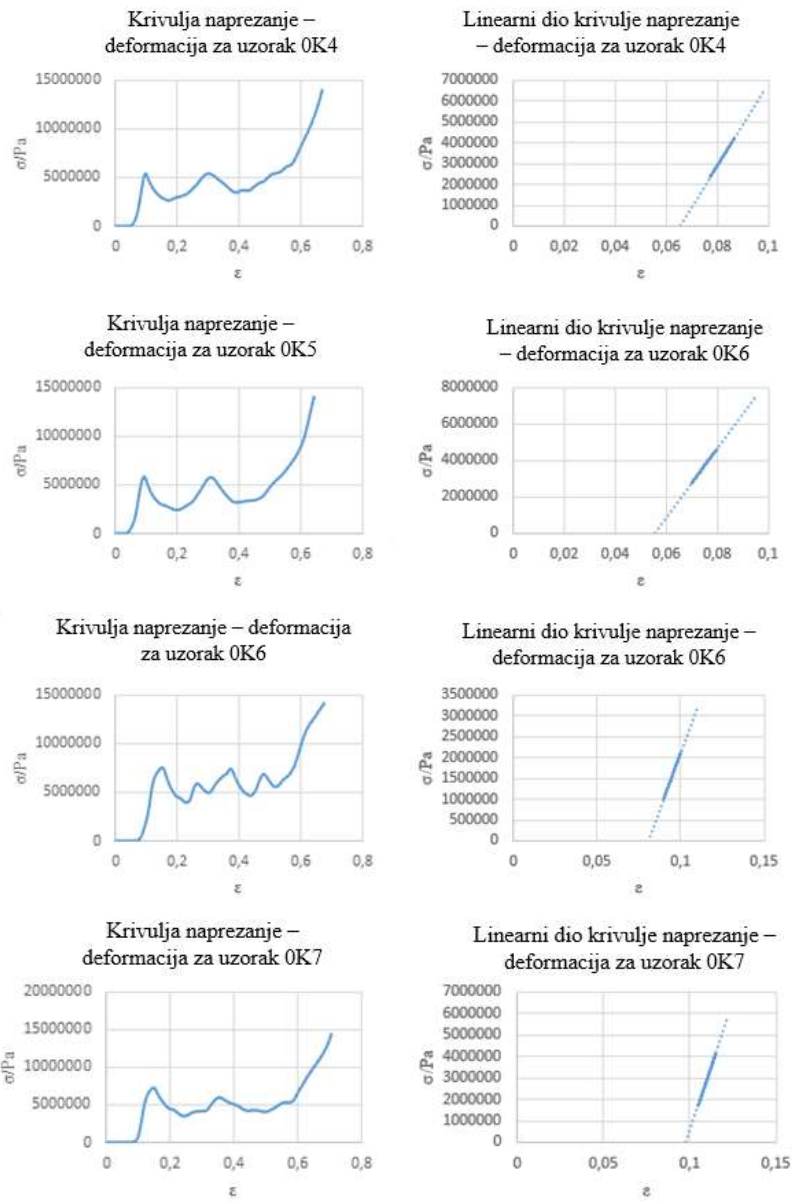
Slika B28. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak C u šestom tjednu razgradnje.



Slika B29. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak C u osmom tjednu razgradnje.

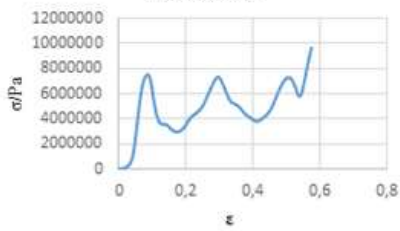


Slika B5. Krivulja naprezanje - deformacija za prve tri replike uzorka **K**.

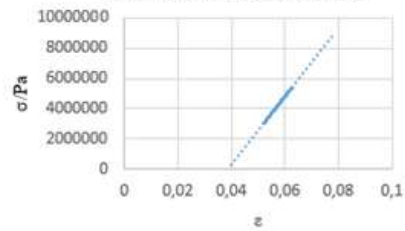


Slika B6. Krivulja naprezanje - deformacija za replike četiri – sedam za uzorak, **K**.

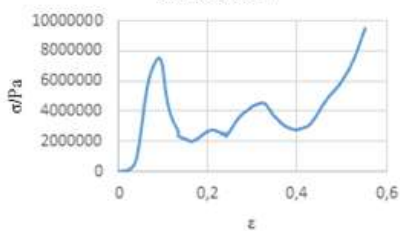
Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak 2P1



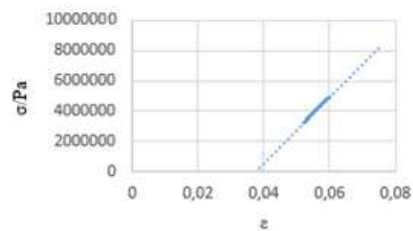
Linearni dio krivulje naprezanje – deformacija za uzorak 2P1



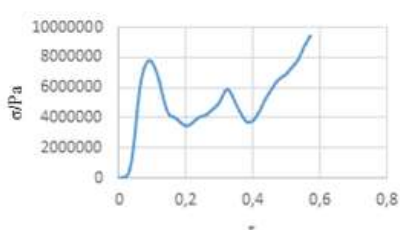
Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak 2P2



Linearni dio krivulje naprezanje – deformacija za uzorak 2P2



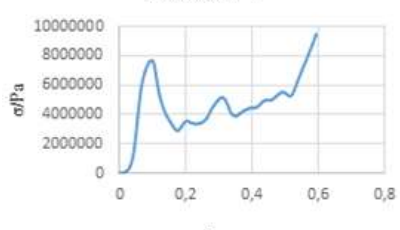
Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak 2P3



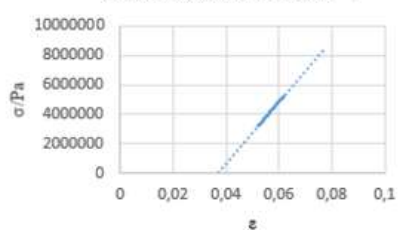
Linearni dio krivulje naprezanje – deformacija za uzorak 2P3



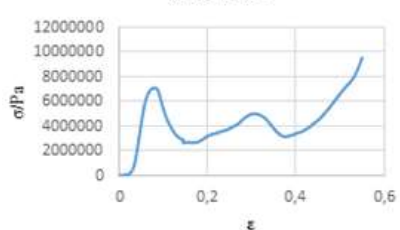
Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak 2P4



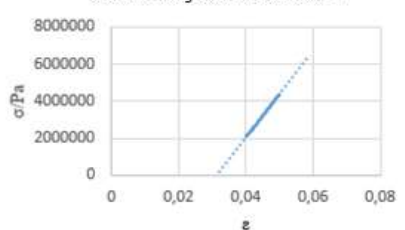
Linearni dio krivulje naprezanje – deformacija za uzorak 2P4



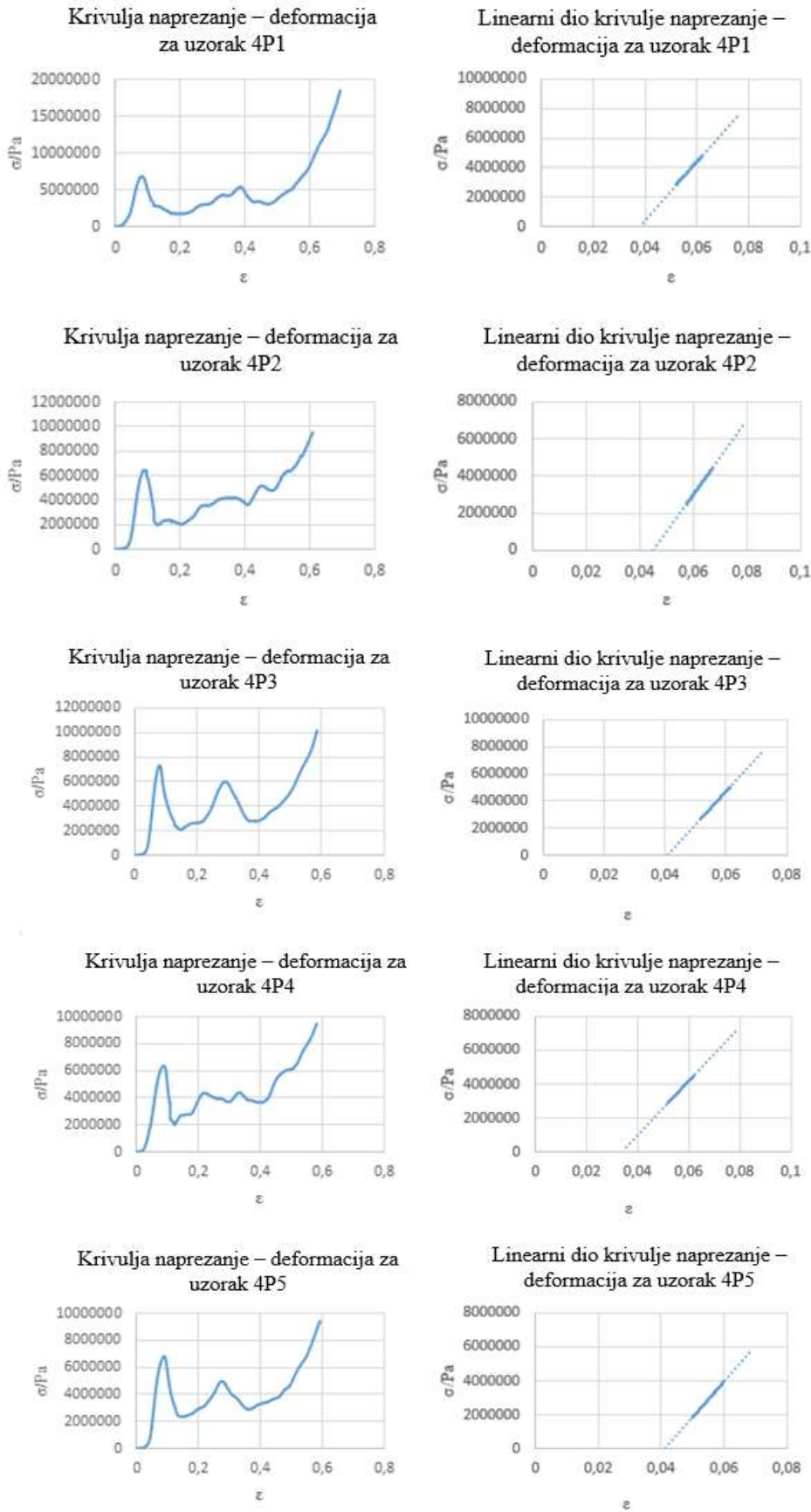
Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak 2P5



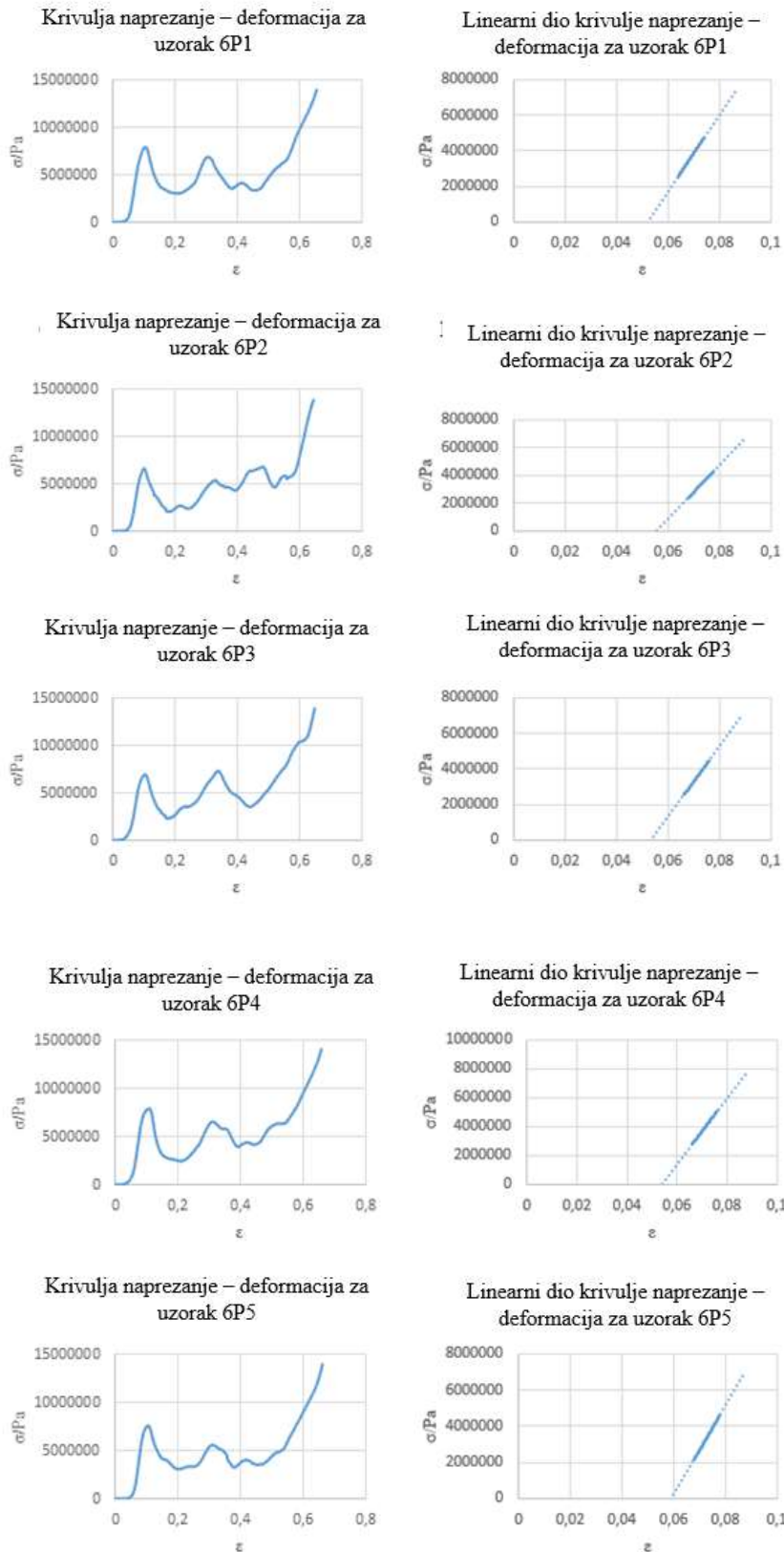
Linearni dio krivulje naprezanje – deformacija za uzorak 2P5



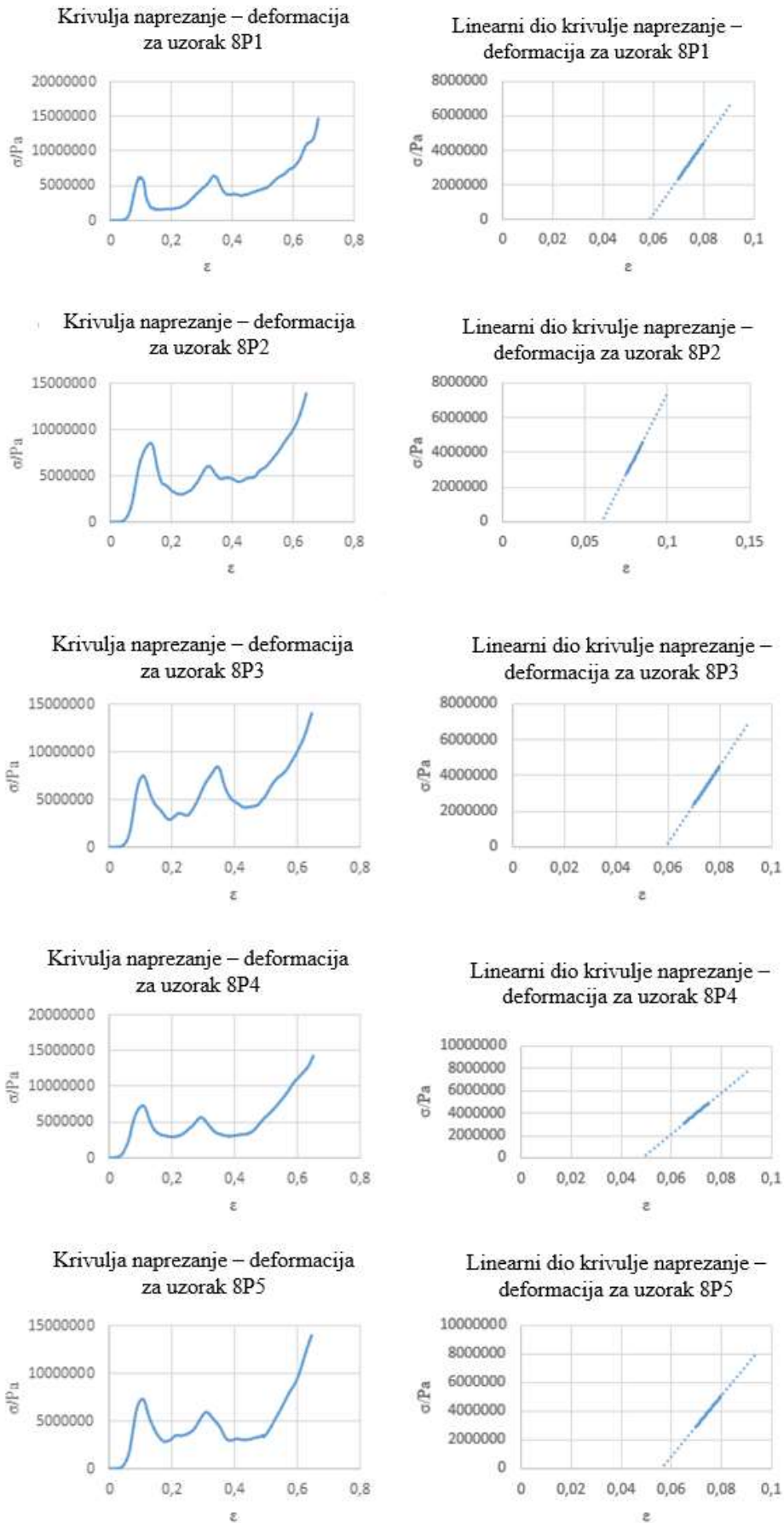
Slika B7. Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak **P** u drugom tjednu razgradnje.



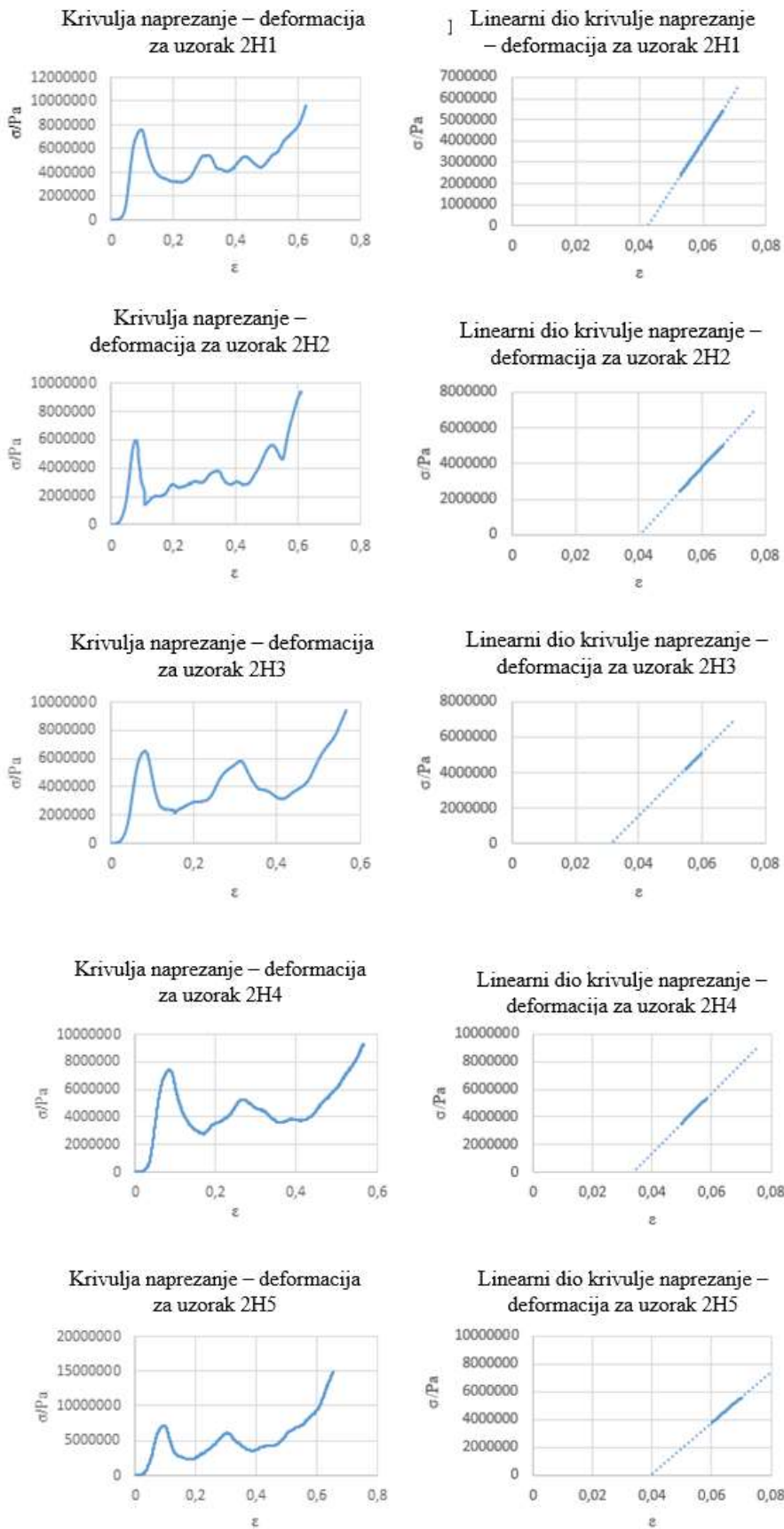
Slika B8. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak P u četvrtom tjednu razgradnje.



Slika B9. Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak P u šestom tjednu razgradnje.

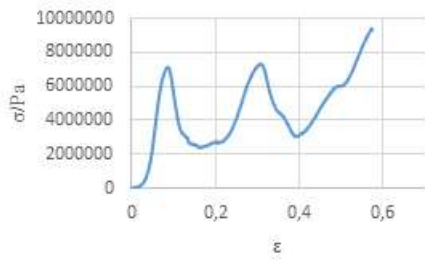


Slika B10. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak **P** u osmom tjednu razgradnje.

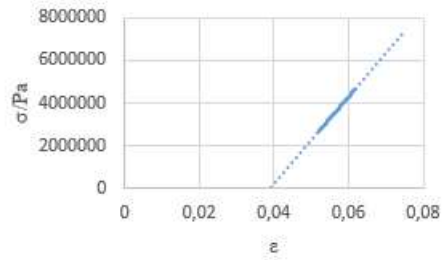


Slika B11. Krivulja naprezanje – deformacija za uzorak **H** u drugom tjednu razgradnje.

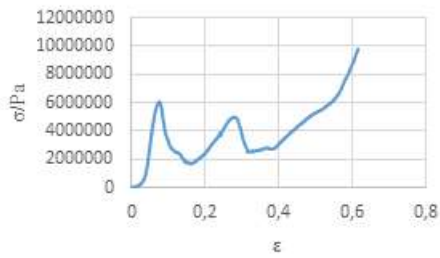
Graf ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H1



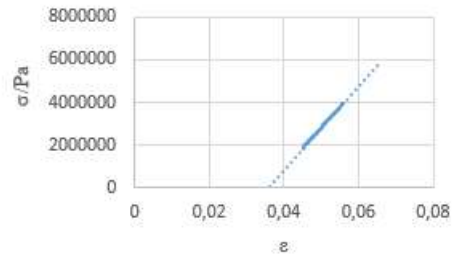
Linearni dio krivulje ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H1



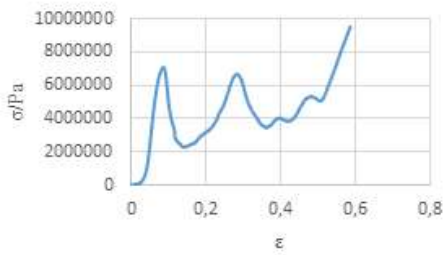
Graf ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H2



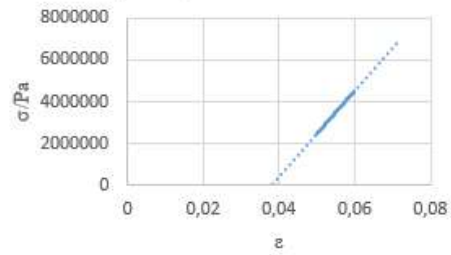
Linearni dio krivulje ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H2



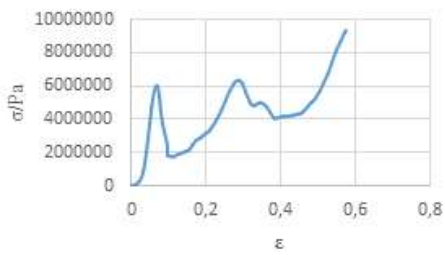
Graf ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H3



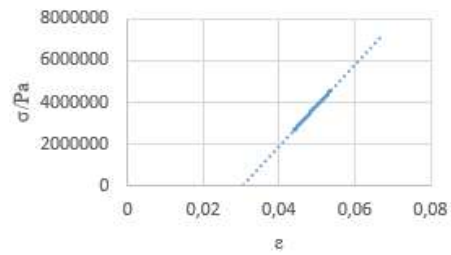
Linearni dio krivulje ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H3



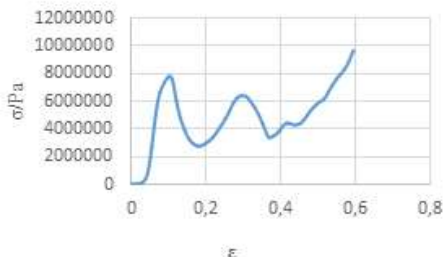
Graf ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H4



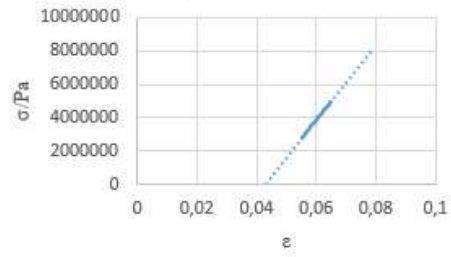
Linearni dio krivulje ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H4



Graf ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H5



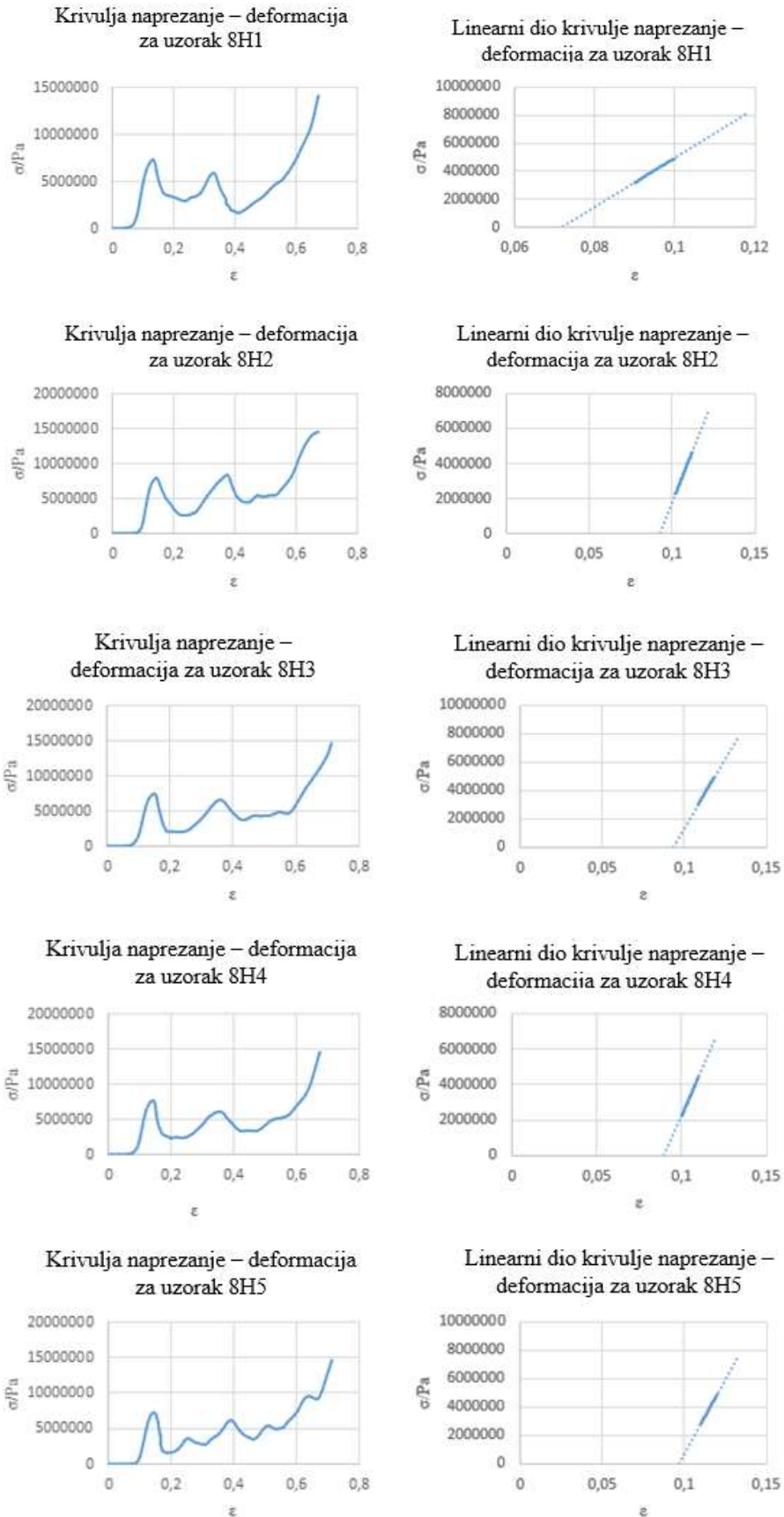
Linearni dio krivulje ovisnosti sila - naprezanje za uzorak 4H5



Slika B12. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak **H** u četvrtom tjednu razgradnje.



Slika B303. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak **H** u šestom tjednu razgradnje.



Slika B14. Krivulja naprezanje - deformacija za uzorak **H** u osmom tjednu razgradnje.