

# Toplinska svojstva kompozita s PLA matricom

---

**Brzić, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:149:484415>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Katarina Brzić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Katarina Brzić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 24. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Marica Ivanković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Krešimir Košutić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Iva Bazina, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 27. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
DIPLOMSKI STUDIJ PRIMIJENJENE KEMIJE

Katarina Brzić

TOPLINSKA SVOJSTVA KOMPOZITA S PLA MATRICOM

DIPLOMSKI RAD

Voditeljica rada : prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva : prof. dr. sc. Marica Ivanković

prof. dr. sc. Krešimir Košutić

izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2024.

*Istraživanja ovoga 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 se provodio na Sveučilištu u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije i poduzeću 3D grupe, Sveta Nedelja. Projekt je financiran iz Europskog strukturnog i investicijskog fonda u sklopu Poziva “Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije”.*

*Prvenstveno želim zahvaliti prof. dr. sc. Marici Ivanković na prihvaćanju mentorstva i pruženoj podršci. Isto tako, velika zahvala ide dr. sc. Leonardu Baueru na neizmjernej pomoći, korisnim savjetima, predloženim literaturama i svim ostalim „sitnicama“ koje su bili od velike koristi za pisanje ovog rada.*

*Želim zahvaliti i svojim roditeljima, Karlu i Slavici te sestrama Luciji i Julijani i bratu Luki što su bili velika podrška tijekom svih godina školovanja.*

*Zahvaljujem i svojim kolegicama s fakulteta, koje su mi prvenstveno prijateljice, a tek onda kolegice.*

*A posebna zahvala ide mom mužu Marku čija su svojstva otpornosti daleko iznad svojstava otpornosti svih kompozita PLA.*

## SAŽETAK

Poli(mliječna kiselina) (PLA), alifatski je poliester izgrađen od monomera mliječne kiseline. Zbog svojih dobrih svojstava te biokompatibilnosti pronašla je primjenu u brojnim aplikacijama, među najvažnijima u medicini. PLA podložna je brojnim mehanizmima razgradnje kao što su hidroliza, mikrobiološka, fotokemijska, toplinska i enzimski razgradnja. Ipak, najvažniji mehanizam razgradnje PLA je hidroliza koja se temelji na kidanju esterskih veza u PLA te cijepanju polimernih lanaca, ulasku vode u strukturu te zatim na razgradnji oligomera do mliječne kiseline i u konačnici do vode i ugljikovog dioksida. Cilj ovog istraživanja bio je pratiti hidrolitičku razgradnju poli(mliječne kiseline) – (tehničkog-PLA, medicinskog praha-PLA i medicinskog filamenta-PLA) koja se koristi kao polimerna matrica kompozitnih materijala. Eksperimenti su provedeni u mediju koji simulira fiziološki sastav, kako bi se oponašali uvjeti u ljudskom tijelu tijekom vremenskog razdoblja od dva, četiri, šest i osam tjedana. Istražen je utjecaj hidrolitičke razgradnje na strukturu i svojstva PLA matrice. Karakterizacija uzoraka prije i nakon razgradnje provedena je pomoću diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), pretražne elektronske mikroskopije (SEM) i mjerenja promjene mase. Ova analiza omogućila je detaljan uvid u toplinska svojstva, morfološke promjene i gubitak mase PLA matrice tijekom razgradnje, pružajući važne informacije o njenoj otpornosti i potencijalnoj primjeni u medicinskim uređajima i biomedicinskim aplikacijama.

Ključne riječi: PLA matrica, hidrolitička razgradnja, struktura, toplinska svojstva

## **ABSTRACT**

Thermal properties of composites with poly(lactic acid) matrix

Poly(lactic acid) (PLA) is an aliphatic polyester made of lactic acid monomers. Because of good properties and biocompatibility, PLA found its use in many applications, most importantly in medicine. PLA is prone to several degradation mechanisms, such as hydrolysis, microbiological, photochemical, thermal and enzymatic degradation. However, the most important PLA degradation mechanism is hydrolysis which is based on the cleavage of the ester bonds initiated by the diffusion of water in the PLA structure, then degrading from oligomers to lactic acid and ultimately to water and carbon dioxide. The aim of this research was to follow the hydrolytic degradation of poly(lactic acid) composites – based on technical-grade PLA, medical-grade PLA powder and medical-grade PLA filament. Experiments were conducted in media that simulate the physiological environment so it can imitate human body conditions during the period of two, four, six and eight weeks. The influence of hydrolytic degradation on the structure and properties of composites with PLA-matrix was investigated. Characterization of samples before and after degradation was made by Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electron Microscope (SEM), and measuring change of mass. This analysis provided a detailed view into thermal properties, morphological changes and mass loss of composites throughout degradation, giving important information about their resistance and potential use in medical instruments and biomedical applications.

Key words: PLA-matrix, hydrolytic degradation, structure, thermal properties

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1 Biorazgradljivi polimeri .....	2
2.2 Poli(mliječna kiselina)-PLA .....	4
2.2.1 Mliječna (laktatna) kiselina-LA .....	4
2.2.2 Sinteza poli(mliječne kiseline)-PLA .....	6
2.2.3 Svojstva poli(mliječne kiseline).....	9
2.2.4 Razgradnja poli(mliječne kiseline), PLA .....	11
2.2.5 Biokompatibilnost PLA.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	20
3.1 Materijali.....	20
3.2 Hidrolitička razgradnja .....	21
3.2.1 Priprema uzoraka za analizu .....	21
3.2.2 Priprema PBS otopine .....	22
3.3 Metode karakterizacije .....	23
3.3.1 Diferencijalna pretražna kalorimetrija.....	23
3.3.2 Pretražna elektronska mikroskopija .....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	26
4.1 DSC analiza .....	26
4.2 Promjena mase uzoraka .....	31
4.3 Analiza mikrostrukture .....	33
5. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA .....	39



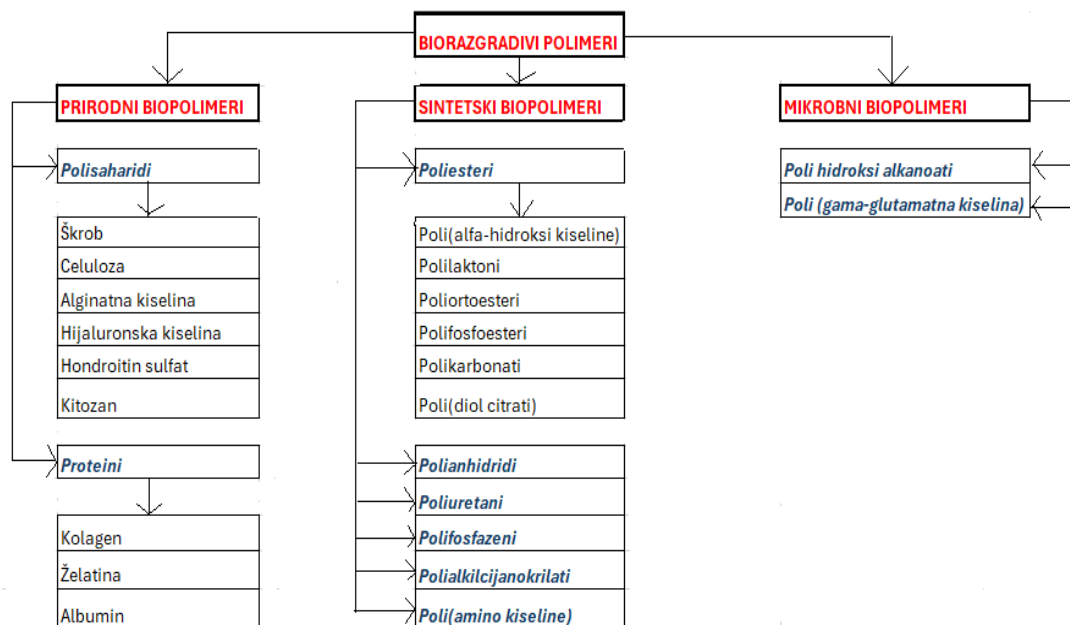
# 1. UVOD

U današnjem svijetu, obnovljivost i održivi razvoj sve su češće upotrebljavani pojmovi, a razlog tome je u brojnim klimatskim promjenama. Ujedinjeni Narodi definiraju održivi razvoj kao način proizvodnje koji zadovoljava potrebe sadašnjeg vremena bez da kompromitira mogućnost da buduće generacije zadovolje svoje potrebe. Sve više se upotrebljava način dizajniranja i proizvodnje koji se može objasniti frazom „od kolijevke do groba“, što govori kako svaki proizvod treba imati svoj „završetak života“ odnosno način kako ga razgraditi. Jedna od takvih tvari, čija ju biorazgradljivost i obnovljivost, kao i poželjna svojstva čine važnom komponentom u brojnim aplikacijama, je poli(mliječna kiselina)- PLA.<sup>1</sup> Kako je rečeno, važnost PLA ogleda se u brojnim aplikacijama, a među važnijima svakako je primjena u medicini. Primarno se u medicini koristi u inženjerstvu tkiva te kao potpora zarastanju rana. Svoju primjenu u organizmu temelji na biokompatibilnosti i jednostavnoj hidrolizi pri kojoj nastaju netoksični produkti.<sup>1,2</sup> Upravo je hidrolitička razgradnja specifičnih tipova PLA tema ovog rada, u kojoj će se njen utjecaj na svojstva materijala detaljnije razraditi.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1 Biorazgradljivi polimeri

Jedan od najvažnijih izazova svijeta današnjice je očuvanje okoliša. Ekološki osviješteni znanstvenici preteča su tog očuvanja u budućnosti, a biorazgradljivi polimeri imaju u tom smislu neizmjernu ulogu. Većina današnjih polimera je uglavnom sintetskog porijekla proizvedena iz petrokemijskih komponenti. Takvi polimeri, dugog životnog vijeka, često zagađuju okoliš što itekako negativno utječe na živi sustav u njemu. Klasičan primjer takvog utjecaja su neprimjereno bačene nerazgradive plastične vrećice koje zagađuju morski svijet. Veliki problem takvih nerazgradljivih polimera leži i u tome što je njihova primjena najčešće kratkog vijeka gdje se nakon toga očekuje njihova primjerena razgradnja i recikliranje, koja troši mnogo novca i energije te ekološki nije održiva. Upravo se zbog navedenih problema javlja velika potreba za biorazgradljivim polimerima koji će pružiti jednako dobru funkciju, a biti ekološki prihvatljivi u smislu njihove razgradnje s manje ili nimalo zagađivanja okoliša<sup>1</sup>. Biorazgradljivi polimeri se najčešće dijele u dvije glavne skupine, prirodni i sintetski polimeri, ovisno o njihovom izvoru. Općenito govoreći, sintetski polimeri imaju brojne prednosti nad prirodnim zbog širokog spektra primjene, specifičnih mehaničkih svojstava, ali i mogućnosti modificiranja degradacije ovisno o željenoj potrebi. Iako i prirodni polimeri imaju zanimljiva i poželjna svojstva poput biokompatibilnosti, zbog mogućih nepoželjnih svojstava poput antigenosti nisu dovoljno istraživani, a samim time nisu ni dovoljno primjenjivani i poželjni kao sintetski biopolimeri.<sup>2</sup> Podjela biorazgradljivih polimera može se vidjeti na *Slici 1*. Prirodni polimeri podijeljeni su na polisaharide koje čine škrob, celuloza, itd. te na proteine koje čine kolagen, želatina i albumin. Od sintetskih polimera važni su poliesteri, a posebice skupina poli(alfa-hidroksi kiselina). Skupina poli(alfa-hidroksi kiselina) jedna je od najistraživanijih skupina biopolimera, posebice u području biomedicine zbog izvrsnih svojstava biokompatibilnosti. U tu skupinu uz poli(mliječnu kiselinu) PLA, pripada i poli(glikolna kiselina) te veliki broj njihovih kopolimera (poli(mliječna-ko-glikolna kiselina)).<sup>2</sup>



Slika 1. Klasifikacija biorazgradljivih polimera<sup>2</sup>

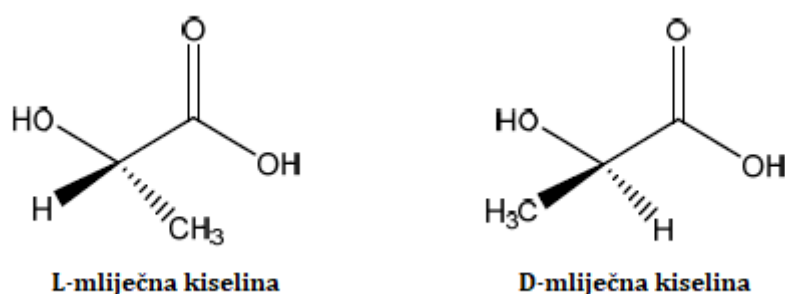
Biopolimeri su pronašli svoju primjenu na brojnim poljima, od kojih je jedno od najvažnijih biomedicina. Važnost primjene biopolimera u biomedicini i zdravstvu temelji se na njihovoj biodegradaciji tj. nastajanju netoksičnih produkata koji neće poremetiti fiziološko okruženje u određenoj primjeni. Neke od medicinskih primjena u kojima biopolimeri imaju potencijalno djelovanje su dostava lijekova raznim putevima (peroralni, parenteralni, itd.), razvoju i potpori tkiva, genskoj terapiji, regenerativnoj medicini, privremenim implantatima, oblaganju implantata, itd. Glavni kriteriji kod odabira biopolimera su prikladnost mehaničkih svojstava, stupanj degradacije ovisno o vrsti aplikacije, netoksičnost produkata degradacije, biokompatibilnost te cijena. Značajnija primjena biopolimera u biomedicinske svrhe pojavila se još 1960-ih godina kada su se u raznim operativnim zahvatima počeli koristiti biorazgradljivi konci na temelju biopolimera. Primjena citostatika kod onkoloških bolesnika također je omogućila prostor za implementaciju biopolimera. *Abraxane* je komercijalni lijek koji je vezanjem biopolimera albumina na generički lijek paklitaksel poboljšao svojstva i djelotvornost aktivne komponente.<sup>2</sup>

## 2.2 Poli(mliječna kiselina)-PLA

Poli(mliječna kiselina) (PLA), kako je već spomenuto, pripada skupini alifatskih poliestera izgrađenih od alfa-hidroksi kiselina. Polimernu strukturu čini monomer mliječne kiseline koja igra važnu ulogu u sintezi i svojstvima poli(mliječne kiseline).<sup>3</sup> Utjecaj stereokemije mliječne kiseline na strukturu i svojstva PLA je velik i bit će obrađen u sljedećim poglavljima.<sup>4</sup>

### 2.2.1 Mliječna (laktatna) kiselina-LA

Mliječna, odnosno laktatna kiselina je 2-hidroksipropanoična kiselina koja se pojavljuje u obliku dva optička izomera, *L*(+) i *D*(-) enantiomera (Slika 2.). *L*-mliječna kiselina se može proizvesti i metabolizirati i u organizmu čovjeka i s pomoću *L*-laktat dehidrogenaze. Upravo je zbog toga *L*-mliječna kiselina poželjna u *in vivo* aplikacijama. Općenito se mliječna kiselina koristi u brojnim svrhama, među koje se može navesti primjena s ciljem regulacije organoleptičkih svojstava, tj. okusa, kao regulator kiselosti raznih proizvoda te kao konzervans u hrani, kozmetici i farmaceutskoj industriji zbog izvrsnog djelovanja na inhibiciju rasta brojnih mikroorganizama. Ipak, najvažnija uloga mliječne kiseline je u sintezi i obradi poli(mliječne kiseline) i poli(mliječne-ko-glikolne kiseline), koje su jedne od najznačajnijih biorazgradljivih i biokompatibilnih polimera današnjice.<sup>5</sup>



Slika 2. *L* i *D*-mliječna kiselina. Preuzeto i prilagođeno prema <sup>6</sup>

U početku se komercijalna mliječna kiselina dobivala fermentacijom šećera pomoću bakterija. Šećeri korišteni za fermentaciju su uključivali škrob, glukozu, laktozu i maltozu proizvedene od kukuruza i krumpira. Fermentacija se odvijala kroz 3 do 5 dana pri niskom pH, niskoj koncentraciji kisika i pri temperaturi od 40 °C. Što je reakcija više napredovala i što se više

mliječne kiseline stvaralo to je navedeni produkt pokazivao određenu toksičnost. Prema tome, kako bi se dobila što čišća (sirova) mliječna kiselina bilo je potrebno uvesti određene metode pročišćavanja. U pročišćavanju se posebno dobrim pokazalo dodavanje kalcijevog hidroksida ili kalcijevog karbonata u fermentiranu smjesu za nastanak kalcijevog laktata, koji se onda vrlo jednostavno uklanja isparavanjem, kristalizacijom i zakiseljavanjem kako bi se očuvala željena sirova mliječna kiselina. Mliječna kiselina koja se proizvodila na ovaj način zahtijevala je još dodatnu razinu pročišćavanja za potrebe primjene u hrani ili medicini.<sup>6</sup>

Sinteza mliječne kiseline kemijskim metodama koja se koristi u industrijskoj proizvodnji, može se podijeliti na tri tipa:

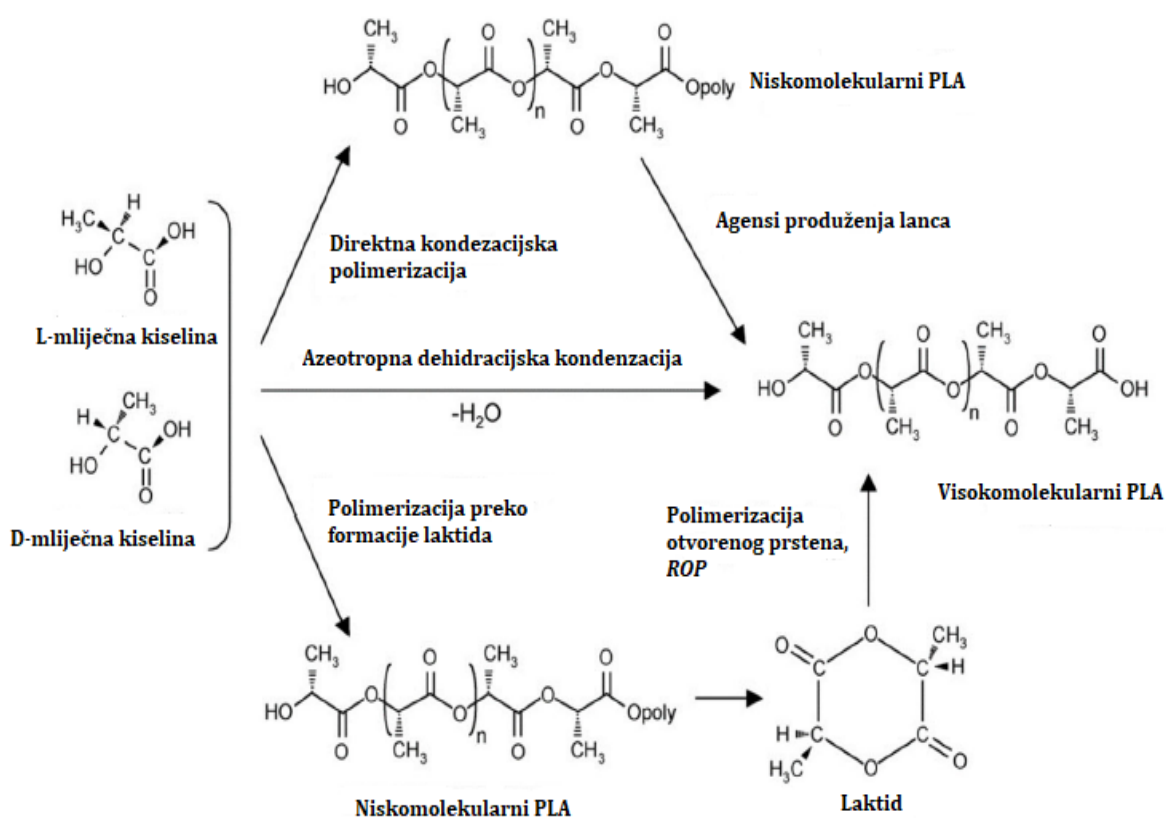
- a) Laktonitrilna metoda – temelji se na hidrolizi laktonitrila pomoću sumporne kiseline kako bi se dobila sirova mliječna kiselina. Sirova mliječna kiselina se zatim dodaje alkoholu radi esterifikacije te se pročišćena mliječna kiselina dobiva destilacijom, koncentriranjem i dekompozicijom (raspadom)
- b) Akrilonitrilna metoda – temelji se na hidrolizi akrilonitrila s pomoću sumporne kiseline. Dobiveni produkt zatim ide u reakciju s metanolom, a dobiveni ester se destilira i pročišćava, nakon čega se zagrijava i vakuumira kako bi se dobio konačni produkt.
- c) Metoda propionske kiseline – dobivanje sirove laktatne kiseline iz propionske kiseline kloriranjem i hidrolizom. Dobiveni produkt se zatim pročišćava esterifikacijom te dodatnom hidrolizom. Metoda se rijetko koristi zbog visoke cijene sirovih materijala.<sup>6</sup>

Kemijske metode, iako u većoj mjeri mogu proizvesti mliječnu kiselinu, pokazuju određenu toksičnost dobivenih sirovih produkata, što ne ide u prilog ekološki održivih metoda, te se kao takve sve manje koriste.<sup>6</sup>

## 2.2.2 Sinteza poli(mliječne kiseline)-PLA

Sinteza poli(mliječne kiseline) temelji se na polimerizaciji mliječne kiseline. Kako je već spomenuto, mliječna kiselina može se nalaziti u svoje dvije optički aktivne konfiguracije, *L* i *D*-mliječna kiselina. Sintetizirana poli(mliječna kiselina) može biti različitih molekulskih masa, dok ona s većom molekulskom masom ima veći kvalitativni te industrijski potencijal.<sup>7</sup>

Sinteza može ići trima glavnim putevima, a to su direktna kondenzacijska polimerizacija, azeotropna dehidracijska kondenzacija te polimerizacija otvorenog prstena (engl. *ring-open polymerization*, *ROP*). Shematski prikaz svih triju sinteza može se vidjeti na Slici 3, a detaljniji opis slijedi i u sljedećim potpoglavljima.<sup>4</sup>



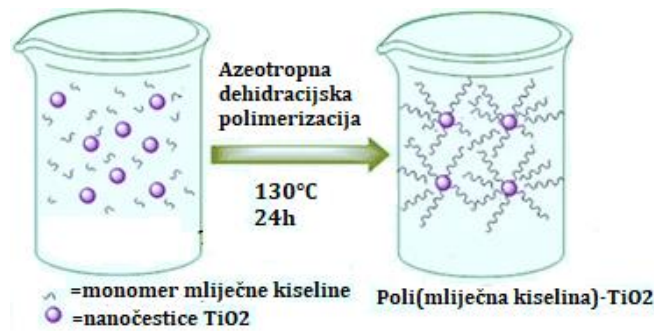
Slika 3. Shematski prikaz tri glavna puta sinteze PLA<sup>6</sup>

### 2.2.2.1 Direktna kondenzacijska polimerizacija

Sinteza poli(mliječne kiseline) direktnom kondenzacijskom polimerizacijom mliječne kiseline zahtjeva najmanje troškove sveukupnog procesa. S druge strane, ovom metodom vrlo je teško sintetizirati i održati visoku molekulsku masu PLA<sup>4</sup> što je od ključne važnosti za kvalitetu PLA<sup>7</sup>. Proces se temelji na dodavanju pomoćnih tvari koji služe kao promotori esterifikacije, tzv. agensi produženja lanca. Cilj takvih tvari je potaknuti polimerizaciju niskomolekularne PLA bilo s hidroksilnom (-OH) ili karboksilnom (-COOH) skupinom tvoreći sve veće lance te u konačnici visoko molekularnu PLA. Agensi produženja lanca koji se koriste u navedenom procesu su razni anhidridi, epoksidi te izocijanati. Problemi ovog procesa odnose se na mogućnost zadržavanja neizreagiranih agenasa produženja lanca, nepotpuno polimeriziranih PLA oligomera i zaostalih metala iz korištenih katalizatora. Kako se takve zaostale komponente moraju ukloniti, to dodatno povećava vrijeme i cijenu samog procesa i stvara dodatan problem. Ipak, prednost je što je konačni produkt nakon pročišćavanja smjese visoke čistoće i visoke kvalitete za daljnju upotrebu.<sup>4</sup>

### 2.2.2.2 Azeotropna dehidracijska polimerizacija

Polimerizacija poli(mliječne kiseline) u azeotropnoj otopini pokazuje veću praktičnost sinteze od direktne polimerizacijske kondenzacije. Azeotrop je smjesa dviju ili više kemijskih tekućina koje se nalaze u točno određenom omjeru te ih se u takvom omjeru ne može odvojiti jednostavnom destilacijom. To se događa jer je nakon vrenja azeotropne smjese omjer pojedinačnih komponenata u pari isti kao i u otopini.<sup>7</sup> Azeotropna dehidracijska polimerizacija podrazumijeva stvaranje dugih lanaca PLA bez korištenja agenasa produženja lanca te njima sličnih pomoćnih tvari. Sam proces je dobro razvijen, a temelji se na smjesi mliječne kiseline i katalizatora (npr. titanijev oksid, TiO<sub>2</sub>)<sup>8</sup> koji se azeotropno dehidriraju u aprotionskom otapalu pod sniženim tlakom kako bi se održala visoka molekulska masa PLA. Proces započinje destilacijom mliječne kiseline pod niskim tlakom tijekom 2-3 h na 130 °C kako bi se uklonila kondenzirana voda. Nakon toga se dodaje katalizator i difenil-eter te se cijev s molekularnim sitom povezuje s reakcijskom posudom. Kako se u cjelokupnom procesu odvija refluks otapala preko spomenutih molekularskih sita i to tijekom 30-40 h na 130 °C, to će pročistiti PLA i učiniti ga željene kvalitete na kraju procesa. Shematski prikaz procesa se može vidjeti na *Slici 4*.<sup>4</sup>

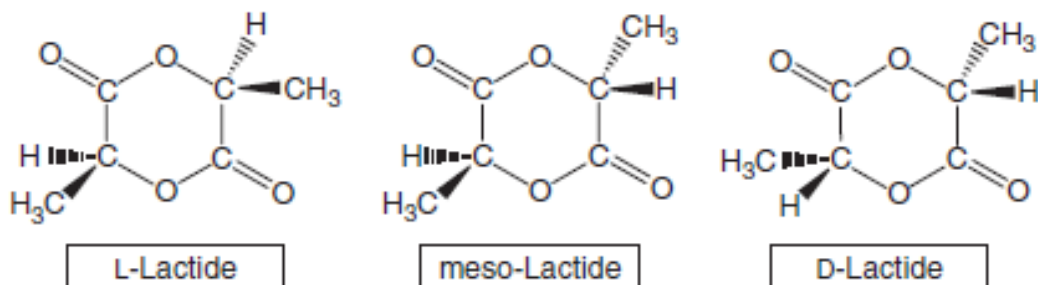


Slika 4. Shematski prikaz azeotropne dehidracijske polimerizacije <sup>8</sup>

Problemi navedenog načina polimerizacije PLA javljaju se u slučaju veće količine zaostataka katalizatora koji sudjeluju u reakciji, koji mogu dovesti do degradacije ili hidrolize dugačkih lanaca PLA. Kako je veća koncentracija zaostalog katalizatora i problem toksičnosti, metode dodavanja fosforne kiseline radi njihove deaktivacije su od velike važnosti. Uz fosforu kiselinu, mogu se koristiti i jake kiseline kao što je sumporna kiselina, pomoću koje će se katalizator istaložiti i tako smanjiti problem navedene toksičnosti.<sup>4</sup>

### 2.2.2.3 Polimerizacija otvaranjem prstena laktida

Polimerizacija otvaranjem prstena laktida (engl. *Ring-open polymerization, ROP*) prvi put je predložena 30-ih godina prošloga stoljeća, no poli(mliječna kiselina) visoke molekulske mase dobivena je tek nakon razvijanja metode od strane DuPont-a 1954. godine. Laktid u procesu nastaje depolimerizacijom poli(mliječne kiseline) niske molekulske mase pod smanjenim tlakom gdje se dobiva smjesa *L*-laktida, *D*-laktida i *meso*-laktida (*LD*-laktida) (Slika 5.). Postotak prisutnosti određenih izomera laktida ovisi o korištenim izomerima mliječne kiseline, temperaturi te katalizatoru.<sup>4</sup>



Slika 5. Kemijska struktura izomera laktida <sup>4</sup>



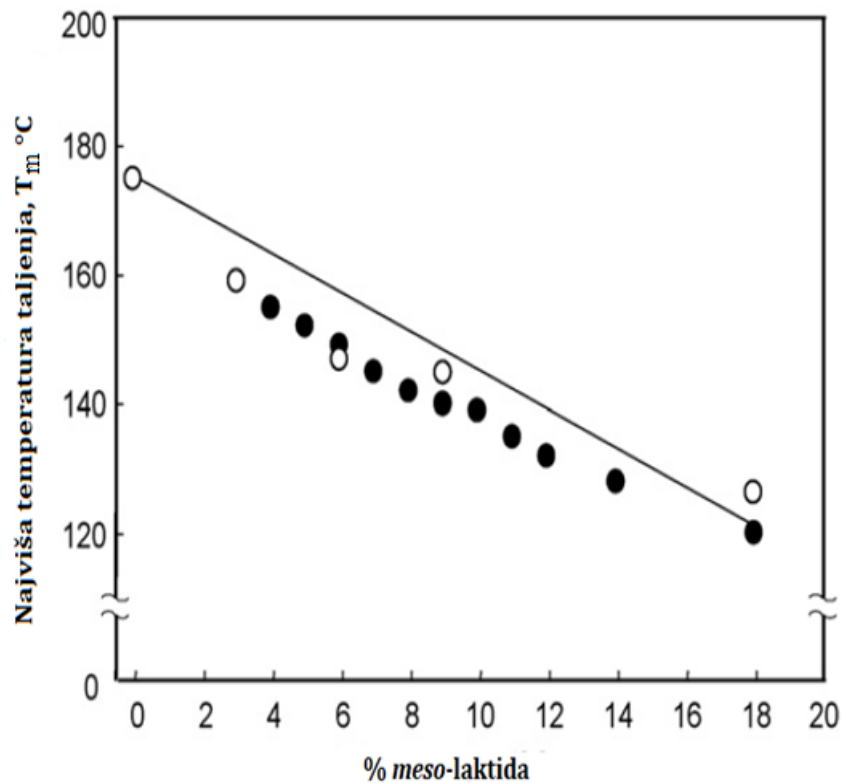
Polimerizacija otvaranjem prstena može se odvijati trima različitim mehanizmima: kationskim, anionskim te koordinacijskim/insercijskim mehanizmom.<sup>6</sup>

Inicijatori kationskog mehanizma su najčešće Lewisove kiseline te alkilirajući ili acilirajući reagensi. Istraženo je kako trifluormetansulfonska kiselina i metilni esteri navedene kiseline mogu vrlo efektivno potaknuti kationsku polimerizaciju laktida u poli(mliječnu kiselinu).<sup>6</sup> Anionska polimerizacija laktida temelji se na nukleofilnoj reakciji karbonilne skupine aniona s laktidom pri čemu nastaju alkoksidne skupine koji se nastavljaju propagirati tj. dovode do dodatnog produljenja lanca odnosno polimerizacije. Oba navedena mehanizma pokazuju visoku reaktivnost, međutim skloni su racemizaciji i transesterifikaciji što dovodi do konačnog produkata s visokom razinom nečistoća. Zbog navedenih problema nečistoće, istraživano je korištenje slabo reaktivnih metalnih karboksilata, oksida i alkoksida te je pokazano dobivanje i zadržavanje visokomolekularne PLA u prisutnosti prijelaznih metala kositra (Sn), cinka (Zn), željeza (Fe) i aluminija (Al) kao katalizatora te tako uvodi novi mehanizam koordinacije/insercije. Posebno se kao katalizator izdvaja kositar(II)-bis-2-etilheksanoična kiselina, primarno zbog niske toksičnosti, visoke katalitičke efikasnosti, mogućnosti dobivanja visokomolekularne PLA s niskom stopom racemizacije tijekom procesa i jer je odobren od američke agencije (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), što potvrđuje biokompatibilnost navedenog spoja.<sup>4</sup> Uz spojeve kositra, navode se i aluminijev alkoxid te spojevi rijetkih metala kao katalizatori u mehanizmu koordinacije/insercije.<sup>6</sup>

### 2.2.3 Svojstva poli(mliječne kiseline)

PLA se u komercijalnom smislu javlja kao kopolimer poli(*L*-mliječne kiseline), PLLA te poli(*D,L*-mliječne kiseline), PDLLA, koji, razumljivo, nastaju iz *L*-laktida te *D,L*-laktida. Kako se *L*-izomer mliječne kiseline većinski nalazi u biološkim izvorima, upravo je i PLA namjenjen za medicinske primjene većinski sastavljen od *L*-monomera. Udio pojedinih izomera u strukturi PLA dovodi i do različitih svojstava. Ovisno o udjelu *L*- i *D,L*-enantiomera PLA može kristalizirati u tri različita oblika –  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Tako je  $\alpha$ -oblik stabilniji s temperaturom taljenja ( $T_m$ ) od 185 °C, za razliku od  $\beta$ -oblika kojemu je  $T_m$  175 °C. Još jedno bitno svojstvo na koje utječe udio izomera mliječne kiseline je i stupanj kristalnosti, gdje je kod udjela *L*-izomera većeg od 90 % PLA kristalast, a kod sastava manjih od toga u amorfnom obliku. Manji udio *L*-izomera dovodi i do niže temperature taljenja  $T_m$ .<sup>9</sup>

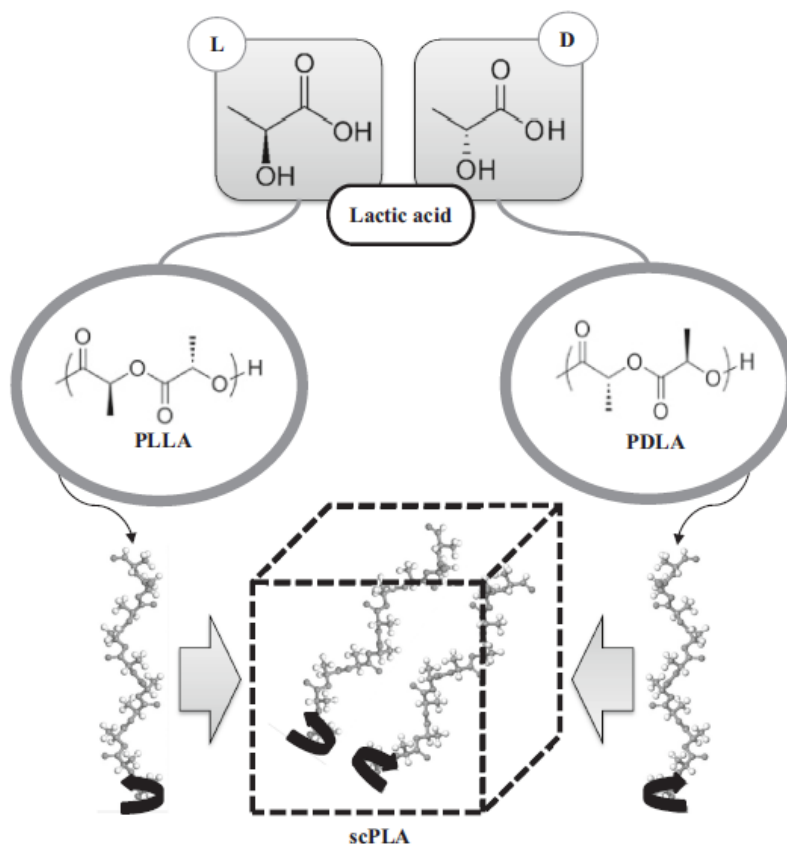
Termalna svojstva PLA očituju se u dvije temperaturne vrijednosti – temperatura staklastog prijelaza, tj. staklište ( $T_g$ ) te temperatura taljenja, tj. talište ( $T_m$ ).  $T_g$  PLA je na otprilike  $58\text{ }^\circ\text{C}$  gdje je iznad te temperature gumast, a ispod staklast. Staklište PLA itekako ovisi o optičkoj čistoći samog polimera (udio izomera u strukturi) te o molekulskoj masi. Pokazano je kako  $T_g$  raste s porastom molekulske mase do određene vrijednosti. Temperatura do koje raste ovisi o udjelu  $L$ -izomera u PLA, tako će konačne  $T_g$  redom biti  $60.2$ ,  $56.4$  te  $54.6\text{ }^\circ\text{C}$  za  $100$ ,  $80$  te  $50\%$  udio  $L$ -izomera. Isto tako, za jednaki udio  $D$ -izomera, vrijednosti  $T_g$  za takvu PLA će biti niže.  $T_m$  PLA je također funkcija optičke čistoće PLA. Najviša moguća  $T_m$  uočena je kod stereokemijski čiste PLA (bilo da je  $L$ - ili  $D$ -laktid prisutan u PLA) je  $180^\circ\text{C}$ . Prisutnost  $D,L$ -laktida (*meso*-laktida može  $T_m$  i za  $50^\circ\text{C}$ . Upravo se na *Slici 6.* može vidjeti linearna ovisnost najviše temperature taljenja  $T_m$  o udjelu  $D,L$ -laktida (*meso*-laktida) u PLA.<sup>9</sup>



Slika 6. Ovisnost  $T_m$  PLA o udjelu meso-laktida<sup>9</sup>

Posebna vrsta PLA uočena je 1987. godine kada su se primijetila specifična svojstva smjese koja je sadržavala PLLA i PDLA. Pokazano je kako navedena smjesa ima temperaturu taljenja  $T_m$  gotovo  $230\text{ }^\circ\text{C}$  što je za  $50\text{ }^\circ\text{C}$  više od optički čiste PLLA. Ovakva „posebna“ smjesa nazvana je stereokompleksna-PLA (sc-PLA). Razlog poboljšanih svojstava sc-PLA temelji se na gustoći pakiranja PLLA i PDLA (*Slika 7*). Takva struktura unutar kompleksa

dovodi i do intermolekularnih veza između metilne i karbonilne skupine različitih enantiomera PLA, što dodatno učvršćuje strukturu.<sup>10</sup>



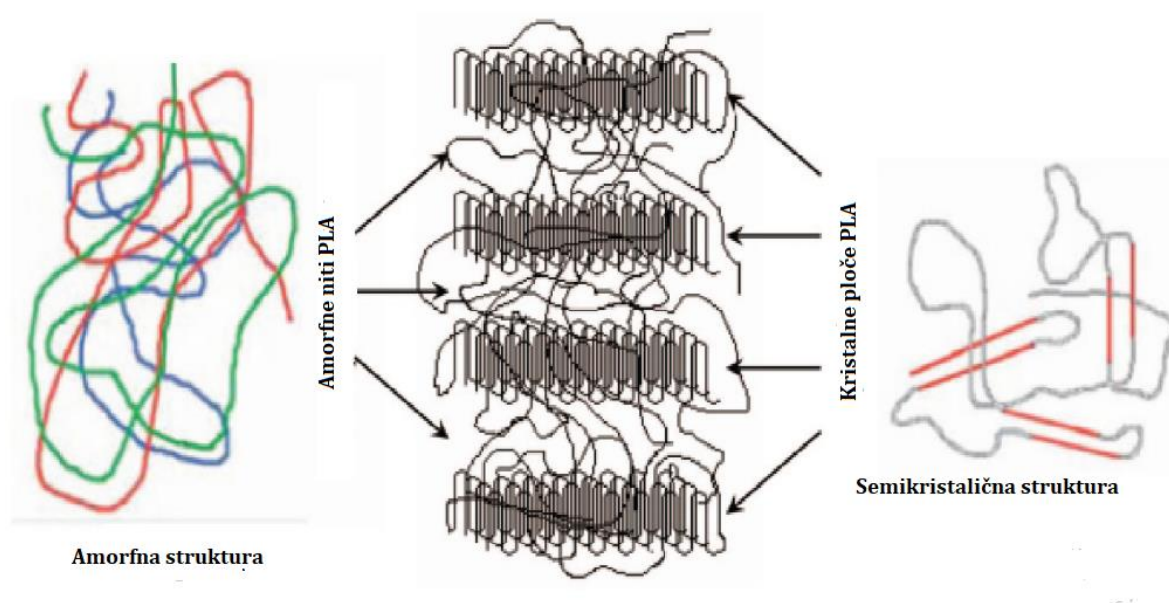
Slika 7. Prikaz gustog pakiranja u strukturi sc-PLA<sup>10</sup>

#### 2.2.4 Razgradnja poli(mliječne kiseline), PLA

PLA se tijekom svog „životnog vijeka“ može suočiti s brojnim okolišnim čimbenicima koji mogu dovesti do njene razgradnje. Svaka razgradnja PLA dovodi do ireverzibilnih promjena koje će u konačnici dovesti i do gubitka esencijalnih svojstava PLA. Različiti mehanizmi mogu dovesti do navedene razgradnje, kao što su kemijska hidroliza, mikrobiološka, fotokemijska, toplinska i enzimaska razgradnja.<sup>11</sup> Konačni produkti koji nastaju u razgradnji PLA su voda, ugljikov dioksid te minimalna količina određenih netoksičnih suvišaka, što je zbog ekološke održivosti velika prednost kod korištenja PLA. Brojni su i faktori koji utječu na razgradnju PLA, a to su: udio *L*- i *D*- izomera u strukturi polimera, temperatura pri kojoj se odvija hidroliza, pH, vlažnost, koncentracija kisika te sama struktura i veličina objekta izgrađenog od polimera.<sup>12</sup>

### 2.2.4.1 Hidrolitička razgradnja PLA

Od svih navedenih mehanizama razgradnje PLA, razgradnja vodom tj. hidroliza PLA je glavni mehanizam.<sup>13</sup> Hidroliza PLA započinje difuzijom molekula vode u amorfnu regiju PLA gdje potiče cijepanje esterskih veza. Tek nakon određenog stupnja hidrolize amorfne regije dolazi do hidrolize kristalne regije PLA<sup>11</sup>, gdje se navedena struktura PLA može vidjeti na *Slici 8*.



*Slika 8. Shematski prikaz amorfne i kristalne strukture PLA<sup>13</sup>*

Hidrolitička razgradnja PLA može se podijeliti na dvije faze:<sup>13</sup>

1. Kidanje esterskih veza u PLA i cijepanje lanaca što dovodi do ulaska vode u strukturu PLA te dodatnu razgradnju i smanjivanje molekulske mase te dobivanje vodotopljivih oligomera.
2. Razgradnja oligomera do mliječne kiseline te kasnije konačna razgradnja do vode i ugljikovog dioksida.<sup>13</sup>

Prva faza hidrolitičke razgradnje uključuje tri glavna mehanizma: autokatalitički te ne-katalitički, cijepanje krajeva lanaca i nasumično cijepanje lanaca, površinsku te volumnu (engl. *bulk*) razgradnju.<sup>13</sup>

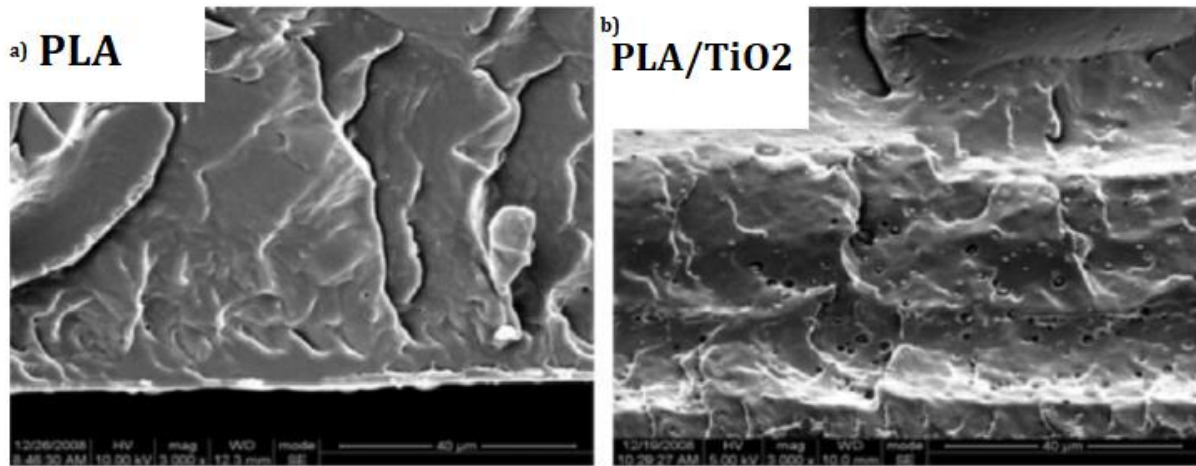
Autokatalitička razgradnja označava hidrolizu PLA pod utjecajem vodotopljivih oligomera i monomera nastalih tijekom iste hidrolitičke razgradnje PLA. Upravo su karboksilne skupine u strukturi nastalih oligomera i monomera zadužene za katalizu cijepanja esterskih veza u strukturi PLA. Isto tako, vodotopljive polimerne molekule bliže površini mogu biti oslobođene prije završetka razgradnje, dok one unutar strukture (mase polimera) ostaju „zarobljene“ te dodatno povećavaju kiselost okoline i sam autokatalitički efekt. Ne-katalitički mehanizam hidrolitičke razgradnje temelji se na cijepanju esterskih veza pod utjecajem samih molekula vode.<sup>13</sup>

Molekulsko cijepanje PLA lanaca, kako je i navedeno, može biti cijepanje esterskih veza na krajevima lanaca, ali isto tako i nasumično gdje dolazi do cijepanja bilo koje esterske veze u cijelom lancu PLA. Međutim, pokazano je kako je primarni mehanizam ipak cijepanje na krajevima lanaca. Isto tako, pokazano je kako i pH utječe na to gdje će se odvijati cijepanje esterskih veza. U kiseloj sredini uglavnom nastaju nasumična cijepanja lanca gdje nastaju netopljivi oligomeri, dok u alkalnoj sredini uglavnom pucaju esterske veze na krajevima lanaca što dovodi do većeg broja vodotopljivih produkata uključujući i mliječnu kiselinu.<sup>13</sup>

Treći tip mehanizma uključuje dva načina razgradnje s obzirom na samu strukturu-površinsku te volumnu (engl. *bulk*) razgradnju. Površinska razgradnja temelji se na gubitku ukupne mase polimera primarno zbog erozije površine, dok prosječna molekulska masa ostaje jednaka. Volumna razgradnja odvija se i na površini i u unutrašnjosti polimera, a temelji se na brzom smanjivanju molekulske mase te smanjivanju volumena polimera. I u slučaju ovih mehanizama razgradnje, pH ima ključnu ulogu. Tako će u alkalnoj sredini (pH=12) primarno doći do površinske razgradnje, a u kiseloj sredini (pH=2) do volumne razgradnje PLA.<sup>13</sup>

Hidroliza PLA ovisi o brojnim faktorima. Kako je već navedeno, pH itekako utječe na sam proces hidrolize te se postavlja pitanje mogućnosti korištenja PLA kao materijala za različite spremnike i boce koji sadržavaju tekućine. Kako se pri ekstremima pH (kiselo i alkalno) hidroliza pojačava, zaključujemo kako se kod korištenja PLA kao spremnika određenih sokova (npr. sok određenog citrusnog voća) hidroliza pojačava te je takva primjena PLA svojevrsni problem. Važan faktor je i temperatura. Pokazano je kako se pri višim temperaturama povećava razina razgradnje PLA zbog bržeg cijepanja esterskih veza.<sup>11</sup> Utjecaj na brzinu hidrolitičke razgradnje ima i prisutnost etanola., Kod PLA uronjenog u 50% etanol primijetila se veća brzina hidrolize zbog brže difuzije molekula etanola u masu polimera nego što difundiraju molekule vode.<sup>12</sup> Prisutnost dodatnih molekula u strukturi PLA utječe na sveukupnu strukturu, a samim time i na svojstva, što je posebno vidljivo u strukturi titanijevog oksida s PLA, PLA/TiO<sub>2</sub>. Naime, TiO<sub>2</sub> nanočestice djeluju tako da mijenjaju

svojstva PLA, a primarno kristalizacijsku strukturu PLA, što dovodi do brže hidrolize. Dokaz takvom učinku vidi se i na slikama SEM analize tijekom praćenja hidrolize same PLA i kombinacije PLA/TiO<sub>2</sub> tijekom 40 tjedana. Na SEM slikama (*Slika 9.*) PLA/TiO<sub>2</sub> vide se veće i učestalije praznine i naborana područja koja ukazuju na bržu i intenzivniju hidrolizu.<sup>12</sup>



*Slika 9. Prikaz SEM slike nakon 40 tjedana hidrolize: a) same PLA i b) PLA/TiO<sub>2</sub>*<sup>12</sup>

#### 2.2.4.2 Mikrobiološka razgradnja (biorazgradnja)

Mikrobiološka razgradnja se općenito odnosi na razgradnju tvari do korisnijih ili manje toksičnih oblika, s pomoću mikroorganizama. Sama mikrobiološka razgradnja se može odvijati u laboratoriju kao i u prirodnom okolišu. Mikrobiološka razgradnja započinje nakon što se visokomolekularna PLA prvo razgradi uslijed hidrolize. Mikroorganizmi koji razgrađuju PLA izlučuju izvanstanične depolimeraze koje ciljaju esterske veze u PLA uz nastajanje oligomera, dimera te monomera što olakšava infiltraciju mikroorganizama. U konačnici nastupa djelovanje međustaničnih enzima koje će potpuno razgraditi PLA do ugljikovog dioksida i vode. Navedenom procesu je ponekad potrebno dodati induktore razgradnje kao što su želatina, elastin, određene aminokiseline te peptide.<sup>12</sup> Općenito, PLA je uglavnom rezistentna na mikrobiološku razgradnju te se na taj način PLA razgrađuje duže vrijeme.

Način na koji se PLA mikrobiološki razgrađuje temelji se na korištenju mulja otpadnih voda (engl. *wastewater sludge*) te gnojiva koja su bogata mikroorganizmima. Najvažnije vrste koje možemo navesti su: kravlje gnojivo, mulj otpadnih voda kokosa, mulj otpadnih voda u mljekarstvu, itd. Najznačajnije sredstvo mikrobiološke razgradnje PLA je mulj otpadnih voda

u mljekarstvu (engl. *dairy wastewater sludge, DWS*), zbog visokog sadržaja dušika koji ubrzava razgradnju. Vrijeme trajanja razgradnja s *DWS* je 15 dana, nakon čega ne ostane ništa od PLA. Zanimljivo je spomenuti kako bakterijske vrste određene u *DWS* čine samo 42,5% svih vrsta, dok njih 57,5% nije identificirano. Od identificiranih vrsta u najvećem udjelu su prisutni: *Actinomadura*, *Pseudoxanthomonas*, *Bacillus*, *Sphingobacterium*, *Corynebacterium*.<sup>12</sup>

Kada se govori općenito o biorazgradnji, zanimljiv primjer razgradnje PLA koji itekako ima veliki potencijal primjene u budućnosti je razgradnja PLA s pomoću ličinki vrste *Tenebrio molitor* (žuti brašnar) što se može vidjeti na *Slici 10*. Navedena vrsta ima sposobnost hranjenja i probavljanja PLA. Najbolji način za probavljanje i razgradnju je suplementacija PLA s mekinjama gdje se tako sprječava kanibalizam ličinki koji je uočen kod razgradnje samo PLA. Poboljšanje probavljanja u kombinaciji PLA s mekinjama povezano je i s povećanjem broja bakterija crijevne mikroflore ličinki žutog brašnara i to *Lactococcus* i *Spiroplasma*, koji sudjeluju u probavljanju. Ovaj način razgradnje zasigurno ima potencijal u recikliranju PLA, a time i u ekološkoj održivosti.<sup>14</sup>



*Slika 10. Prikaz ličinki Tenebrio molitor tijekom razgradnje PLA* <sup>14</sup>

### **2.2.4.3 Termička razgradnja PLA**

PLA je uz ostale načine razgradnje osjetljiv i na visoku temperaturu tj. na termičku razgradnju tijekom koje dolazi do smanjenja molekulske mase PLA te promjene u mehaničkim svojstvima. Ponekad se kod istraživanja termičke razgradnje PLA može pogrešno interpretirati utjecaj temperature, a sve zbog potencijalnog zaostatka vode u PLA koja će

dovesti do hidrolitičke razgradnje i tako maskirati utjecaj same termičke razgradnje. Zbog toga se kod istraživanja termičke razgradnje PLA preporučuje njeno sušenje.<sup>11</sup>

Termička razgradnja PLA vrlo je zahtjevan proces kojeg karakterizira nekoliko mehanizama te nekoliko različitih produkata razgradnje. Mehanizmi koji uključuju termičku razgradnju PLA iznad 200 °C su intra i intermolekularna esterska izmjena, cis-eliminacija, radikalna i usklađena ne-radikalna reakcija. Određeni autori smatraju da tijekom termičke razgradnje nastupa jedan od navedenih mehanizama, dok neki smatraju da se odvija više od dva mehanizma kao što su npr. nasumično izrezivanje lanaca, depolimerizacija „otkopčavanjem“ te intermolekularna transesterifikacija. Produkti koju nastaju tijekom razgradnje su niskomolekularne PLA, linearni te ciklički oligomeri PLA različitih molekulskih masa i laktidi. Od ostalih produkata mogu se navesti i ugljikov monoksid (CO), ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>), acetaldehid te metil-ketoni. Nastajanje acetaldehida se povećava s temperaturom, no uočena je najveća koncentracija pri temperaturi od 230 °C, nakon koje se do 440 °C uočava padajući efekt koncentracije acetaldehida primarno jer se i on sam pri tim temperaturama razgrađuje do metana (CH<sub>4</sub>) i ugljikovog monoksida (CO).<sup>11</sup>

Zaštita PLA od termičke razgradnje tijekom procesa razvoja i proizvodnje temelji se na zaštiti hidroksilnih skupina na krajevima lanaca PLA koristeći agense produženja lanca. Također jedan od važnih načina zaštite je procesom acetilacije, koji ne samo da dovodi do zaštite krajeva lanaca PLA nego i uklanja ostatne metale (posebno kositar, Sn) koji inače ubrzavaju proces razgradnje.<sup>11</sup>

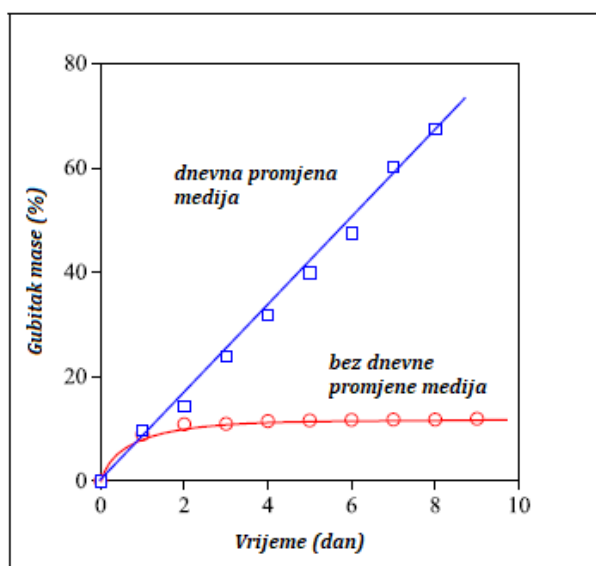
#### **2.2.4.4 Enzimska razgradnja PLA**

PLA je jedan od najistraživanijih biopolimera u smislu enzimske razgradnje. Brojni enzimi su se koristili kako bi se uvidio njihov učinak na razgradnju PLA, uključujući kutinaze, lipaze, proteaze te esteraze. Od svih nabrojanih enzima najveću efikasnost u razgradnji PLA pokazuju alkalne proteaze i to se najčešće koristi komercijalno pripravljena Proteinaza K. Na samu razgradnju utječu brojni parametri kao što su sama koncentracija enzima, temperatura, molekulska masa PLA te pH medija u kojem se razgradnja odvija. Naime, povećanjem koncentracije enzima, povećava se i stupanj razgradnje, ali samo do određenih koncentracija enzima nakon koje ostaje konstantna. Što se tiče temperature, smatralo se kako se razgradnja PLA najefikasnija odvija pri temperaturi od 37°C, no u radovima novijeg datuma pokazalo se



kako je oko 50°C.<sup>15</sup> Molekulska masa PLA utječe minimalno, i to tako da povećanjem molekulske mase dolazi do smanjenja stupnja razgradnje.<sup>15</sup>

Jedan od najvažnijih čimbenika enzimske razgradnje PLA je pH medija. Tijekom enzimske razgradnje PLA nastaje mliječna kiselina zbog koje se pH počinje sve više smanjivati (medij postaje kiselij) kako ona sve više nastaje. Problem nastane jer se enzimi, posebice Proteinaza K, denaturira pri kiselom pH. Kada pH padne ispod 5 proces se potpuno zaustavlja zbog potpuno denaturacije enzima. Kako bi se spriječilo zaustavljanje procesa razgradnje PLA zbog snižavanja pH, uvedena je dnevna promjena medija razgradnje koja održava razgradnju konstantnom. S druge strane, bez dnevne promjene medija razgradnje, razgradnja se zaustavlja. Navedeni utjecaj dnevne promjene medija razgradnje može se vidjeti na grafičkom prikazu na *Slici 11*.<sup>15</sup>



*Slika 11. Grafički prikaz usporedbe gubitka mase PLA tijekom nekoliko dana u slučaju dnevne promjene medija razgradnje i bez nje*<sup>15</sup>

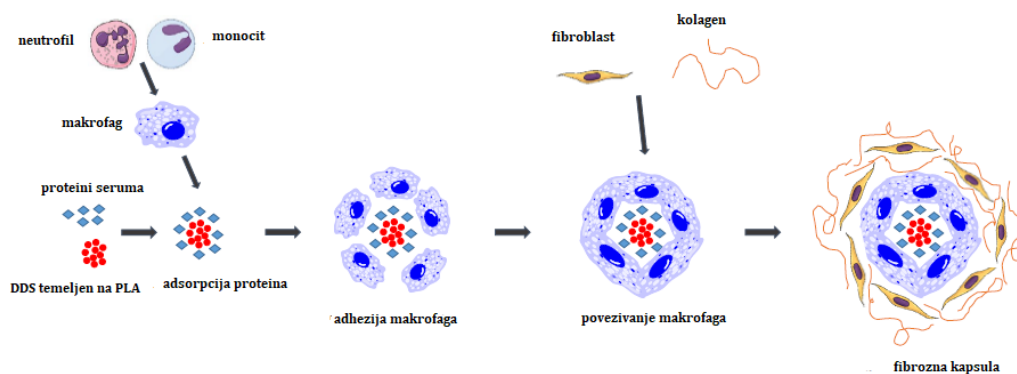
### 2.2.5 Biokompatibilnost PLA

Biokompatibilnost PLA testirana je i dokazana u brojnim radovima i *in vitro* i *in vivo*. Kako je i navedeno, PLA se razgrađuje brojnim mehanizmima među kojima su i enzimi koji se nalaze u organizmu s pomoću kojih nastaje mliječna kiselina te u konačnici CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O koji se iz organizmu eliminiraju respiracijom, fecesom i urinom. Općenito, nema zabilježenih slučajeva

akumulacije produkata razgradnje PLA prilikom njihove aplikacije u niskoj koncentraciji. Međutim, postoji potencijalna mogućnost nedovoljno dobre razgradnje PLA te nakupljanja mliječne kiseline koja tada može izazvati određeni biološki i upalni odgovor u dodiru s tkivom. Isto tako, tijekom samog procesa razgradnje nastaju i brojni produkti koji mogu izazvati i imunski odgovor organizma putem makrofaga. Djelovanje makrofaga se temelji na unosu i razgradnji mikročestica PLA tj. na fagocitozi, koju zbog njihove veličine ne mogu lako izvesti. Postoji, međutim, način na koji to uspijevaju izvesti, a to je otpuštanje određenih štetnih agenasa u blizini površine mikročestica PLA kojom se one razgrađuju (smanjuju) što olakšava fagocitozu. Isto tako, unutar makrofaga je prisutan kiseli medij (pH=3) što dodatno olakšava razgradnju PLA. Važno je naglasiti i kako biokompatibilnost nije samo svojstvo određene tvari koju pokušavamo usporediti s organskim sustavima, nego se ogleda i u intenzitetu i duljini specifične polimer-tkivo interakcije, a ovisi i o samom tkivu s kojim je polimer u interakciji. Tako npr. vremenski produljen kontakt polimera i tkiva može dovesti do neželjenih upalnih procesa, ozljeda ili imunološkog neprihvatanja samog polimera u organizmu.<sup>16</sup>

PLA se u organizmu često primjenjuje kao dio „sustava dostave lijeka“ (engl. *Drug delivery system*, DDS) i to najčešće intramuskularno (IM) i subkutano (SC). Kod upalnog procesa u interakciji DDS-a temeljenog na PLA i tkiva razlikujemo tri različita koraka u kojima sudjeluju makrofagi drukčijim mehanizmom od fagocitoze (*Slika 12.*)<sup>16</sup>:

1. Organizacija upalnih tvari i upalnog odgovora
2. Migracija monocita do mjesta aplikacije DDS gdje se diferencira u makrofage. Isto tako razvija se i fibrozna kapsula građena od fibroblasta i kolagena.
3. Brza razgradnja PLA i formiranje fibroznog tkiva.<sup>16</sup>



*Slika 12. Shematski prikaz imunskog odgovora organizma na prisutnost DDS temeljenog na PLA*<sup>16</sup>

Uz navedeni način razgradnje, treba spomenuti i prepoznavanje intravenozno primijenjenih nanočestica PLA s pomoću retikuloendotelnog sustava (RES) koja dovodi do fagocitoze. Kako je vidljivo, PLA oblici koji se primjenjuju u organizam skloni su razgradnji zahvaljujući imunosnom sustavu u organizmu te prema tome postoji potreba zaštite PLA. Najčešći načini zaštite su modifikacija površine PLA s pomoću polietilenglikola (PEG), poloksamera te različitih polisaharida koji u velikoj mjeri smanjuju fagocitozu PLA.<sup>16</sup>

Kada se govori o primjeni PLA u organizmu najčešće se povezuje s implantatima u mišićno-koštanom sustavu, kao npr. za rast tkiva te za fiksaciju koštanih fraktura.<sup>11</sup> Jedan od razloga zašto je PLA sve češća u takvoj primjeni je njena mogućnost razgradnje s vremenom, što joj daje prednost nad ostalim netopljivim materijalima koji se koriste u istu svrhu. Upravo jedan od primjera korištenja PLA je u kombinaciji s hidroksiapatitom i ostalim kalcijevim fosfatima, koji su glavni minerali u koštanom sustavu koji mu daje čvrstoću i stabilnost.<sup>17</sup> Također, implantati temeljeni na PLA pokazuju i sposobnost poticanja rasta prirodnih stanica u svojoj blizini te tako mogu biti korisni kod određenih gubitaka organa. U tom smislu, može se navesti i kako je Američko društvo plastičnih kirurga promoviralo dermalne filere izgrađene od PLA, a oni stimuliraju proizvodnju kolagena u ljudskom tijelu, a primarno su namijenjeni za poboljšanje izgleda lica.<sup>11</sup>

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

Ekperimentalni dio ovog diplomskog rada nastavak je znanstveno-istraživačkog rada istraživačke grupe koja djeluje u Laboratoriju za biomaterijale i tkivno inženjerstvo (LabTI) na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, u Zavodu za fizikalnu kemiju.

U istraživanjima projekta BIDEAS, koja su prethodila ovom diplomskom radu, analizirano je ponašanje i razgradnja sličnih materijala. Tijekom ubrzane simulirane razgradnje u biološkom mediju ispitano je ponašanje tehničkog-PLA i praška-PLA medicinske čistoće. Ispitano je i ponašanje kompozitnog materijala temeljenog na trodimenzionaloj strukturi PLA filamenta-medicinske čistoće, ispisanom aditivnom proizvodnjom, ispunjenoj hidrogelom na temelju kitozana i hidroksiapatita. Svako od provedenih istraživanja pružilo je informacije koje su vodile u sljedeći korak projekta. Kod pripremljenih kompozitnih uzoraka glavnu ulogu iz pogleda mehaničke otpornosti i brzine razgradnje nosio je polimerni dio sačinjen od poli(mliječne kiseline). Ovaj diplomski rad koncentrirat će se na karakterizaciju dosad korištenih različitih PLA materijala unutar istog istraživanja.

Glavni zadatak ovog diplomskog rada je usporediti ponašanje i svojstva materijala na temelju različitih poli(mliječnih kiselina) pri istim uvjetima razgradnje. Rezultati ovog diplomskog rada omogućit će usporedbu dosad provedenih istraživanja i povezivanje zaključaka, osnažiti dosad stečena saznanja i pomoći u usmjeravanju budućih istraživanja.

#### **3.1 Materijali**

U ovom istraživanju, tri različite vrste alifatskog poliestera polilaktida (PLA) visoke molekulske mase korištene su kao materijal za pripremu polimerne matrice. Početni PLA materijal karakteriziran je svojstvima poput bezbojnosti, sjaja, tvrdoće te visoke čvrstoće i modula elastičnosti, čineći ga plastomerom s iznimnim svojstvima.

## MATERIJALI

- Tehnički-PLA – proizvođač NatureWorks (4043D) koji se često koristi za 3D printanje; u granulama
- Medicinski prah-PLA – proizvođač Carbosynth (FP158009) koji je u potpunosti amorfan i koristi se u tkivnom inženjerstvu; bijeli prah
- Medicinski filament-PLA – proizvođač Poly-Med Inc. (Lactoprene® 100M), promjera 1.75 mm predstavlja PLA medicinske kvalitete s određenim udjelom kristalnosti, a koristi se kao filament za 3D printanje

U eksperimentalnom dijelu ovog istraživanja, pratila se *in vitro* razgradnja različitih PLA tijekom osam tjedana. Ovaj proces odvijao se u mediju koji je simulirao fiziološki sastav, odnosno uvjete slične onima u tijelu.

### 3.2 Hidrolitička razgradnja

Hidrolitička *in vitro* degradacija uzoraka provodila se u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS) na biološkoj temperaturi od 37 °C tijekom 8 tjedana. Pripremljeni uzorci su stavljeni u prethodno označene staklene čašice s poklopcem u koje je dodana pripremljena PBS otopina. Svaka 84 sata potrebno je zamijeniti PBS otopinu uz dodatak natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) koncentracije 0,2 mg/mL. Natrijev azid je biocid koji se koristi kako bi se spriječio razvoj mikroorganizama u mediju. Staklene čašice su označene s obzirom na vrstu materijala i broj tjedana tijekom kojih se prati degradacija. Prema tome, tehnički-PLA označen je oznakom **T**, medicinski prah-PLA (u daljnjem tekstu prah-PLA) oznakom **C** i medicinski filament-PLA (u daljnjem tekstu filament-PLA) oznakom **P**. Uzorci su se promatrali svaka dva tjedna, odnosno 2., 4., 6. i 8. tjedan. Isto tako, zbog točnosti rezultata, mjerena su po tri uzorka za svaku vrstu materijala te se kao vrijednost mase uzimala aritmetička sredina ta tri mjerenja za pojedinu vrstu materijala.

#### 3.2.1 Priprema uzoraka za analizu

Za daljnju analizu i karakterizaciju prethodno navedeni materijali su izvagani (250-280 mg), stavljeni u silikonski kalup nakon čega su stavljeni u sušionik Nuve (FN 055)(*Slika 13*).

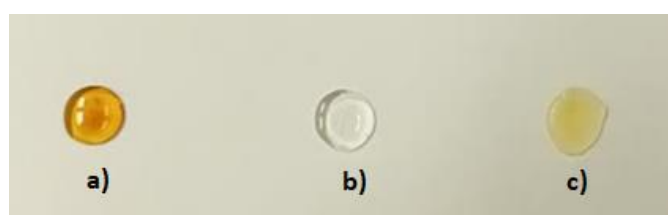


*Slika 13. Sušionik Nuve (FN 055)*

Tehničkom-PLA koji je u granulama i filamentu-PLA nije dovoljno da temperatura samo prijeđe temperaturu staklastog prijelaza (staklište), nego mora prijeći i iznad tališta kako bi se polimer rastalio i poprimio oblik. Prema tome, navedeni uzorci su stavljeni u sušionik kroz 12 sati na temperaturi od 220 °C, a zatim 2 sata na 100 °C te 1 sat na 50 °C.

Kod praha-PLA je bilo dovoljno da temperatura prijeđe iznad staklišta koje je na oko 65 °C, nakon čega je polimer omekšan. Uzorci medicinskog PLA stavljeni su u sušionik kroz 12 sati na temperaturi od 100 °C, zatim 2 sata na temperaturi od 75 °C te 1 sat na 50 °C.

Na *Slici 14.* prikazani su navedeni PLA uzorci nakon njihove pripreme.



*Slika 14. Prikaz istraživanih uzoraka PLA pripremljenih iz: tehničkog-PLA, (a) praha-PLA, (b) i filamenta-PLA, (c).*

### **3.2.2 Priprema PBS otopine**

Fosfatno puferirana otopina pripremljena je u odmjerne tikvici od 500 mL na magnetskoj miješalici. Pripremljena je koncentrirana PBS otopina (10×). Soli su izvagane na analitičkoj

vagi i prikazane u *Tablici 1*. Kod pripreme otopine u tikvicu se prvo doda 400 mL deionizirane vode, a zatim se dodaju pojedinačne komponente redom kao što je prikazano u *Tablici 1*. Sve kemikalije koje su korištene imaju visoki stupanj čistoće (pro analysi p.a.). Priprema 10× PBS otopine na magnetskoj miješalici bez zagrijavanja osigurava ravnomjerno otapanje soli i homogenu otopinu. Nakon što se posljednja komponenta otopi i volumen dopuni do oznake, otopina je spremna za upotrebu tj. daljnje razrjeđivanje na radnu koncentraciju (1× PBS).

Pripremljena 10× PBS otopina prebačena je u sterilnu bocu i pohranjena u hladnjak.

*Tablica 1. Potrebne soli za pripremu PBS otopine*

<u><b>KOMPONENTE</b></u>	<u><b>masa/g</b></u>
<u><b>Natrijev klorid</b></u>	40,0
<u><b>Kalijev klorid</b></u>	1,0
<u><b>Natrijev hidrogenfosfat bezvodni</b></u>	7,2
<u><b>Kalijev dihidrogenfosfat</b></u>	1,225

### **3.3 Metode karakterizacije**

#### **3.3.1 Diferencijalna pretražna kalorimetrija**

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) je toplinska metoda koja se koristi za određivanje temperatura i toplinskih tokova povezanih s faznim i drugim prijelazima u materijalima. Mjerenja pružaju kvalitativne i kvantitativne informacije o fizičkim i kemijskim procesima koji uključuju endotermne i egzotermne efekte ili promjene toplinskog kapaciteta. DSC analizom moguće je dobiti uvid u temperature staklastih prijelaza materijala, temperature taljenja i kristalizacije, kao i odrediti stupanj kristalnosti materijala. Metoda se temelji na mjerenju razlike toplinskog toka između uzorka i referentnog uzorka, pri čemu je mjerni signal proporcionalan razlici toplinskog toka.<sup>19</sup>

Mjerenja su provedena na uređaju DSC 3500 Sirius Netzsch opremljenim s hladnjakom IC70 Netzsch (*Slika 15.*) u zatvorenim aluminijskim posudicama probušenih poklopaca u atmosferi dušika. Mase uzoraka su u rasponu od 15 do 20 mg. Mjerenje se odvija u temperaturnom

području od -20 °C do 220 °C s brzinom grijanja od 10 °C/min kroz dva ciklusa zagrijavanja i hlađenja.



*Slika 15. DSC uređaj 3500 Sirius Netzsch*

### **3.3.2 Pretražna elektronska mikroskopija**

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) je tehnika koja se koristi za analizu površina uzoraka i omogućuje detaljan uvid u morfologiju i mikrostrukturu materijala. SEM koristi fokusirani snop visokoenergijskih elektrona za stvaranje signala na površini čvrstih uzoraka. Uzorak se drži pod vakuumom kako bi se osiguralo da snop elektrona ostane fokusiran i da ne dođe do interakcije s česticama iz zraka. Kada snop elektrona pogodi uzorak, uzrokuje oslobađanje sekundarnih elektrona iz površine uzorka, čime se dobiva slika temeljena na površinskoj topografiji.<sup>20</sup> Dva najčešće korištena detektora su detektor sekundarnih elektrona (SED) i detektor povratno raspršenih elektrona (BSE). Elektroni koji stupaju u interakciju s detektorima stvaraju sliku uzorka. Prednost SEM analize je ta što je metoda nedestruktivna, što znači da ne dolazi do gubitka volumena uzorka, omogućujući višekratnu analizu istih materijala.<sup>21</sup>

Mikrostruktura PLA uzoraka tijekom razgradnje praćena je s pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM) TESCAN Vega3SEM Easyprobe, prikazanog na *Slici 16*. Analiza je provedena za uzorke nakon 0. i 8. tjedna, a snimljeni su površina i presjek loma uzorka. Budući da je riječ o nevodljivim materijalima, prije analize, uzorci su napareni nekoliko minuta vodljivim materijalima – zlato i paladij. Naparivanje je proces u kojem se u plazmi



argona na površinu uzorka nanosi tanki sloj vodljivog materijala, obično metala kao što su zlato, paladij, platina ili ugljik. Metalni sloj omogućava električnoj struji da teče kroz uzorak, sprječavajući nakupljanje električnog naboja. Također, uzorci su dodatno premazani s koloidnom otopinom srebra (engl. *Colloidal Silver Liquid*) po rubovima zbog bolje vodljivosti.

EDS (Spektroskopija energetske disperzije) analiza je tehnika koja se koristi u kombinaciji s pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) za kemijsku karakterizaciju uzoraka. EDS analiza je metoda koja omogućava identifikaciju i kvantifikaciju kemijskih elemenata prisutnih u uzorku. Ova tehnika koristi karakteristične X-zrake koje nastaju kao rezultat interakcije elektronskog snopa SEM-a s uzorkom.<sup>22</sup>



*Slika 16. Pretražni elektronski mikroskop SEM Tescan Vega 3*

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

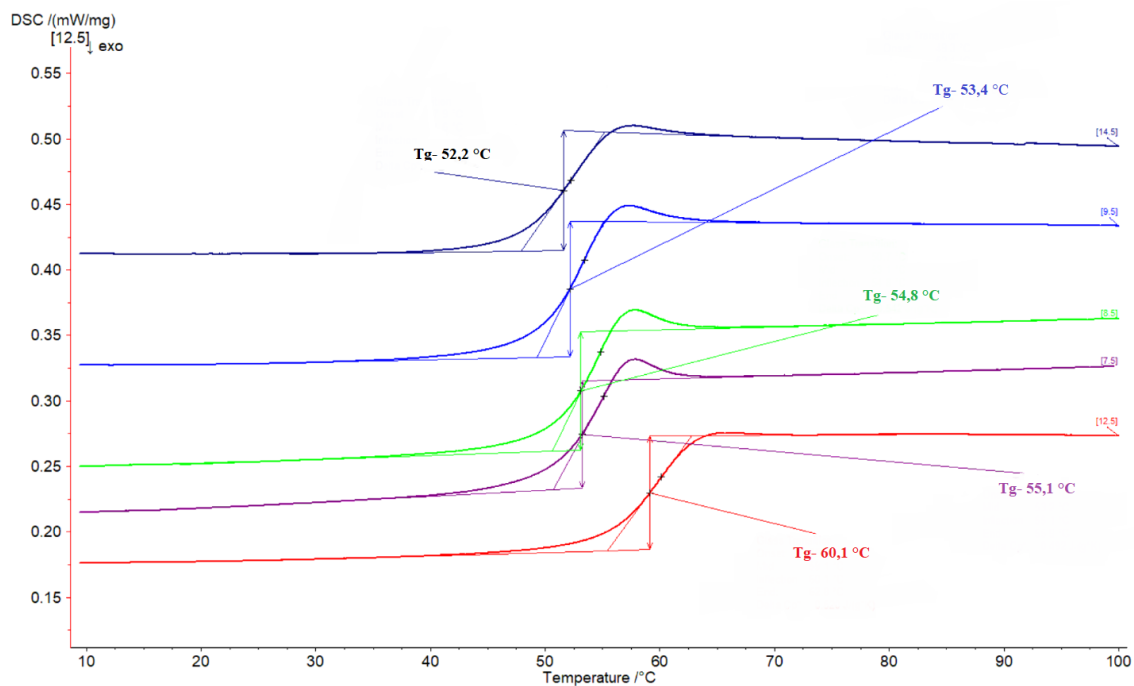
Svaki polimer ima jedinstvenu strukturu koja određuje njegova toplinska svojstva. Prijelazne temperature povezuju strukturu polimera s njegovim svojstvima. U ovom radu, prijelazne temperature i toplinska svojstva polimera ispitivane su tehnikom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), morfologija uzoraka je ispitana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Praćena je i promjena mase tijekom 8 tjedana razgradnje.

### 4.1 DSC analiza

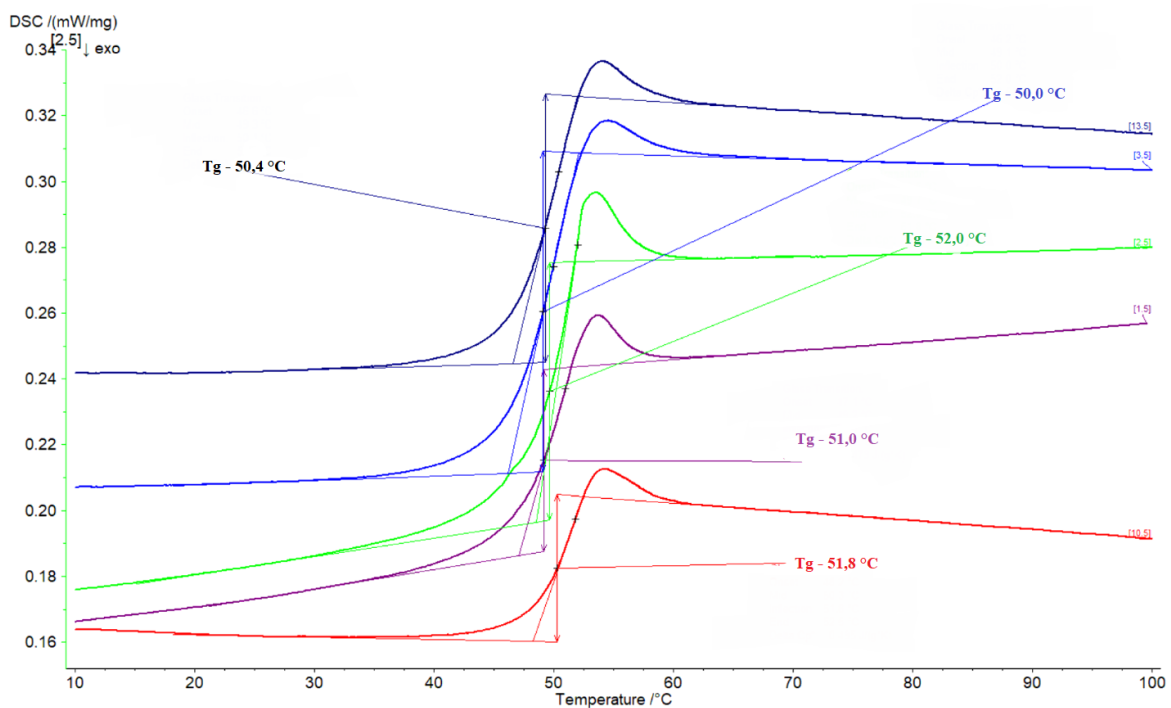
Toplinska svojstva tehničkog-PLA, prah-PLA i filament-PLA istražena su DSC analizom u neizotermnim uvjetima. Iz dobivenih DSC termograma određeni su fazni prijelazi: temperatura staklastog prijelaza ( $T_g$ ) za sve materijale i temperatura taljenja ( $T_m$ ) za filament-PLA. Tijekom prvog ciklusa zagrijavanja uklanja se toplinska povijest materijala nastala tijekom prerade polimera, stoga su vrijednosti faznih prijelaza određene iz drugog ciklusa zagrijavanja. Zagrijavanjem materijala dolazi do apsorpcije topline, što uzrokuje povećano gibanje molekula unutar materijala. Molekule nisu statične, već imaju mogućnost gibanja, što predstavlja prvu promjenu koja se događa.<sup>23</sup> Kod polimera, ova pojava naziva se staklasti prijelaz i određuje se kao staklišće ( $T_g$ ). Nastavak zagrijavanja i daljnja apsorpcija topline dovode do eventualnog taljenja polimernog materijala (ako je polimer kristalast), pri čemu se mijenja agregatno stanje – kruti polimer prelazi u tekuće stanje. Ova promjena slobodnog kretanja molekula unutar materijala bilježi se kao temperatura taljenja ( $T_m$ )<sup>24,32</sup>. Rezultati DSC analize prikazani su na *Slikama 17-20.*, a karakteristične vrijednosti su sumarno prikazane u *Tablici 2 i 3.*

*Tablica 2. Prikaz temperature staklastog prijelaza 2. ciklusa zagrijavanja tehničkog-PLA, prah-PLA i filament-PLA prije i nakon različitog perioda hidrolitičke razgradnje u PBS otopini*

TEMEPARATURA STAKLASTOG PRIJELAZA ( $T_g$ )			
VRIJEME	TEHNIČKI-PLA	PRAH-PLA	FILAMENT-PLA
0. tjedan	60,1 °C	51,8 °C	63,1 °C
2. tjedan	55,1 °C	51,0 °C	63,1 °C
4. tjedan	54,8 °C	52,0 °C	60,6 °C
6. tjedan	53,4 °C	50,0 °C	61,4 °C
8. tjedan	52,2 °C	50,4 °C	62,2 °C



Slika 17. DSC krivulje tehničkog-PLA prije i nakon hidrolitičke razgradnje (crvena - 0. tjedan, ljubičasta – 2. tjedan, zelena – 4. tjedan, plava – 6. tjedan, crna 8. tjedan)



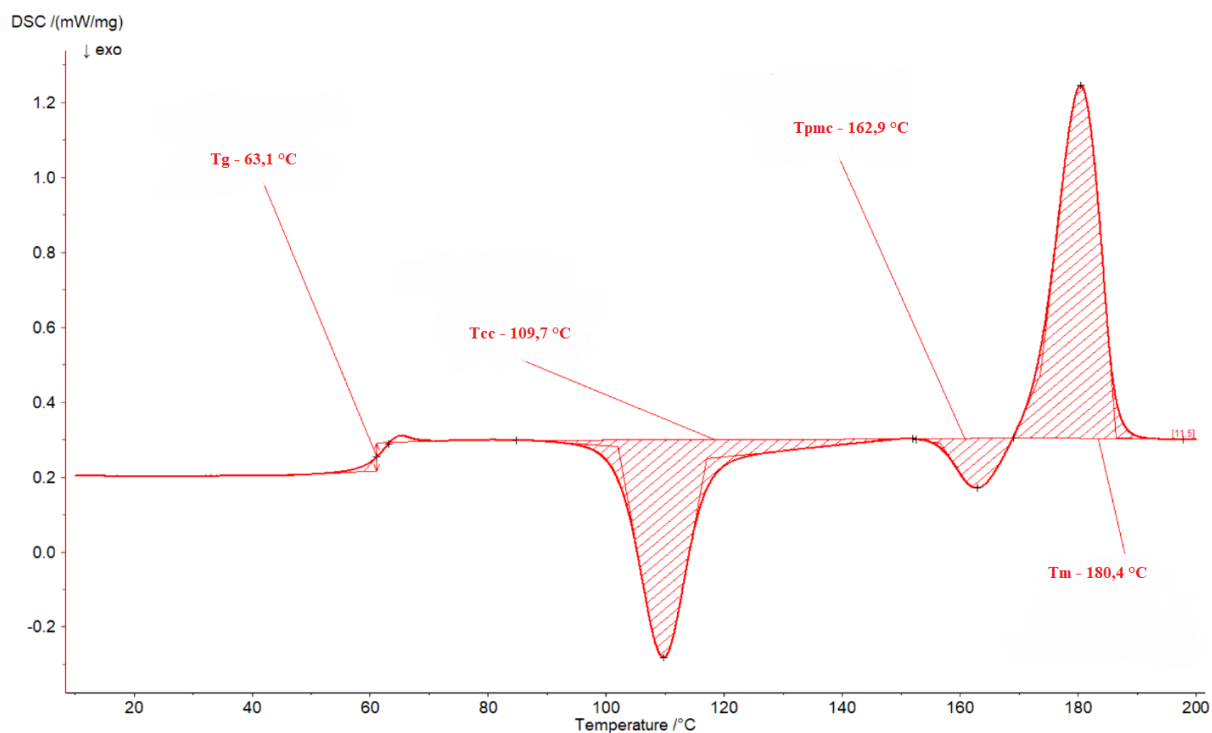
Slika 18. DSC krivulje prah-PLA prije i nakon hidrolitičke razgradnje (crvena – 0. tjedan, ljubičasta – 2. tjedan, zelena – 4. tjedan, plava – 6. tjedan, crna 8- tjedan)

Prema DSC krivulji na *Slici 17.* za tehnički-PLA nakon 2. ciklusa zagrijavanja, temperatura staklastog prijelaza prije razgradnje iznosi 60,1 °C, dok nakon razgradnje se vrijednost temperature staklastog prijelaza smanjuje i iznosi 52,2 °C. S obzirom na značajno smanjenje temperature staklastog prijelaza, može se zaključiti da je tehnički-PLA doživio najveću degradaciju. Uočava se i trend pomicanja krivulja prema lijevo.

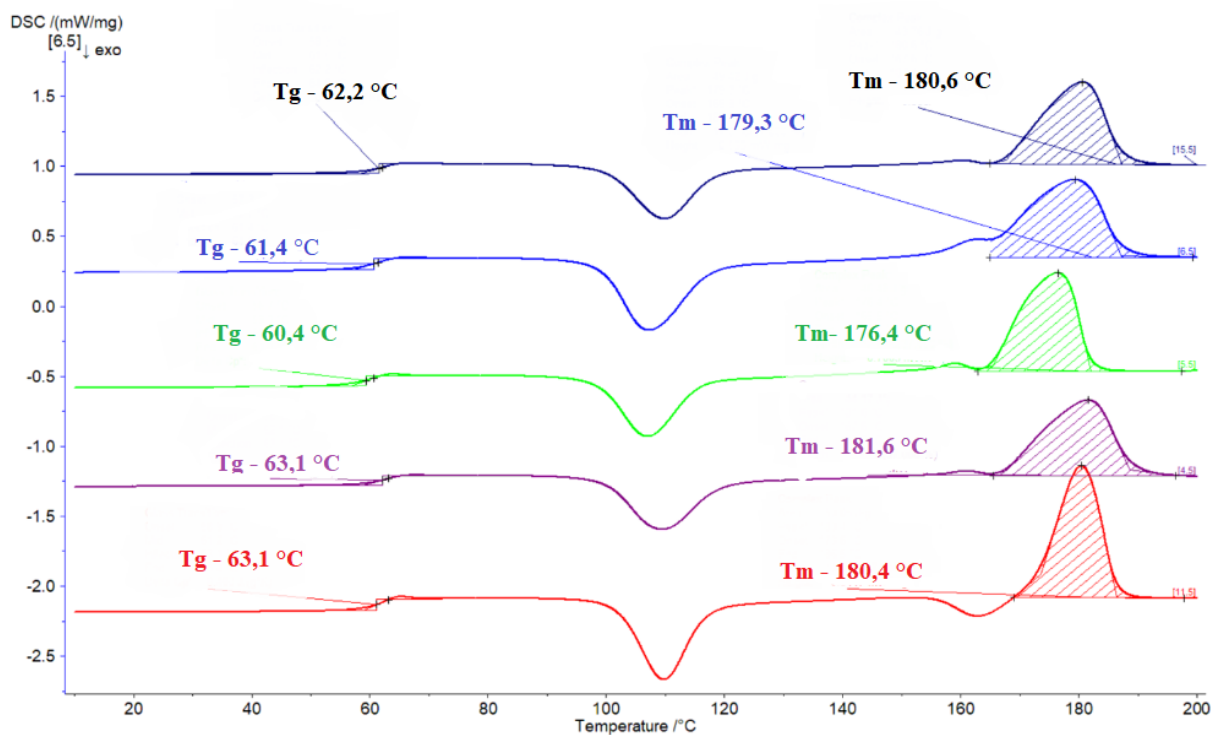
Temperature staklastog prijelaza za prah-PLA su niže u odnosu na tehnički-PLA i filament-PLA, što je posljedica činjenice da je prah-PLA u potpunosti amorfan materijal. Budući da je riječ o amorfnom polimeru, na DSC krivulji vidljiv je samo staklasti prijelaz.<sup>25</sup> Prema *Slici 18.* za medicinski PLA nakon 2. ciklusa zagrijavanja, temperatura staklastog prijelaza prije razgradnje iznosi 51,8 °C, dok je nakon razgradnje vrijednost pala i iznosi 50,4 °C, što je u okviru eksperimentalne pogreške. Kako nije došlo do značajne razlike i sniženja staklišta kroz 8 tjedana, može se pretpostaviti da uzorak na temelju prah-PLA nije značajno degradirao. Odstupanje se primjećuje kod 4. tjedna, što može biti rezultat promjene uvjeta tijekom razgradnje materijala ili kao eksperimentalna greška.

Slijedi filament-PLA, koji je modificirani polilaktidni (PLA) materijal medicinske čistoće namijenjen za korištenje u aditivnoj proizvodnji 3D ispisom. Kod njega se osim staklastog prijelaza, uočava i pojava tališta zbog određenog stupnja kristalnosti polimernog materijala. Nakon postizanja temperature staklastog prijelaza, daljnjim zagrijavanjem povećava se gibanje makromolekula PLA, što dovodi do njihove reorganizacije i oslobađanja energije. Egzotermna promjena na termogramu ukazuje na proces hladne kristalizacije, s izraženim maksimumom pika na 109,7 °C ( $T_{cc}$ ). To sugerira da PLA nije potpuno kristalizirao tijekom hlađenja brzinom od 10 °C/min. Hladna kristalizacija nastupa jer molekularni lanci polilaktida postaju dovoljno fleksibilni za kristalizaciju nakon staklastog prijelaza. Zagrijavanjem lanci dobivaju dovoljno energije i preslagivanjem nastoje prijeći u stanje koje ima manju energiju, iz neuređene strukture u nešto uređeniju strukturu. Toplina dobivena zagrijavanjem daje im više energije za kretanje i težnju prema stabilnijem stanju, a to je kristalno stanje.<sup>23,26</sup> Kako je kristalno stanje stabilnije od amornog stanja, dolazi do oslobađanja viška energije, odakle dolazi egzotermni vrhunac kristalizacije. Nakon velikog egzoternog prijelaza hladne kristalizacije slijedi mali egzotermni prijelaz koji odgovara rekristalizaciji tj. kristalizaciji prije taljenja, s izraženim maksimumom pika na 162,9 °C ( $T_{pmc}$ ). Kristalizacija prije taljenja se odnosi na reorganizaciju kristalnih struktura neposredno prije temperature taljenja ( $T_m$ ).<sup>26,27</sup> Ovaj proces uključuje slaganje složenijih i kompliciranijih kristalnih struktura za koje je potrebno više energije. Sve opisane pojave za filament-PLA prije razgradnje vidljive su na

Slici 19. Na Slici 20. prikazani su termogrami filament-PLA materijala u ispitivanim tjednima tijekom simulirane biološke razgradnje.



Slika 19. DSC krivulja filament-PLA prije razgradnje (0. tjedan)



Slika 20. DSC krivulje filament-PLA prije i nakon hidrolitičke razgradnje (crvena – 0. tjedan, ljubičasta – 2. tjedan, zelena – 4. tjedan, plava – 6. tjedan, crna – 8. tjedan)

Tablica 3. Prikaz temperature taljenja filament-PLA prije i nakon hidrolitičke razgradnje u PBS otopini

TEMPERATURA TALJENJA ( $T_m$ )	
VRIJEME	Filament-PLA
0. tjedan	180,4 °C
2. tjedan	181,6 °C
4. tjedan	176,4 °C
6. tjedan	179,3 °C
8. tjedan	180,6 °C

Temperature staklastog prijelaza ( $T_g$ ) za filament-PLA najviše su u usporedbi s prethodna dva materijala. Povećanje udjela kristaliničnih regija u PLA-u dovodi do povećanja  $T_g$ . To je zbog toga što kristalinične strukture unutar materijala imaju veću termodinamičku stabilnost, što zahtijeva više energije za promjenu molekularne konformacije iz staklastog stanja u gumasto stanje, što rezultira višim vrijednostima  $T_g$ . Prije razgradnje, temperatura staklastog prijelaza iznosi 63,1 °C, dok nakon 8 tjedana razgradnje temperatura staklastog prijelaza je snižena na 62,2 °C. Kod filament-PLA primjećuju se varijacije temperature staklastog prijelaza od 2 °C. Ove varijacije mogu ukazivati na različite faktore koji utječu na materijal, uključujući proces proizvodnje, sastav materijala ili uvjete okoline.

Prema *Slici 20.* površina egzotermnih vrhova koje pripisujemo hladnoj kristalizaciji ostaje otprilike konstantna, bez značajnih promjena s vremenom hidrolitičke razgradnje. U odnosu na početni materijal (0. tjedan), taljenje kreće pri nižoj temperaturi i dolazi do preklapanja endoternog vrha taljenja s egzotermnim vrhom rekristalizacije. Općenito PLA je poznat po tome da pokazuje različite kristalne oblike prvenstveno alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) i gama ( $\gamma$ ). Alfa oblik nastaje pri višim temperaturama i smatra se stabilnijim od ostalih oblika. Tijekom kristalizacije prije taljenja moguće je da dolazi do prijelaza iz jednog oblika u drugi.

Kod filament-PLA, talište se pojavljuje jer je polimer djelomično kristalan. Kristalinične regije unutar PLA razlog su pojave jasno definiranog endoternog pika uslijed taljenja, koji se može uočiti na DSC krivulji. Taj pik označava temperaturu na kojoj kristalinične strukture prelaze iz čvrstog u tekuće stanje. Prema DSC krivulji, temperatura taljenja prije razgradnje iznosi 180,4 °C. Tijekom razgradnje, može se uočiti trend gdje taljenje započinje pri sve nižim temperaturama. Ovaj pad temperature taljenja mogao bi ukazivati na utjecaj PBS

medija na kristalizaciju i veličinu kristalita. Postojanje kristalita manjih veličina dovodi do nižih temperatura taljenja.<sup>28-30</sup> Hidrolitička razgradnja PLA odvija se uglavnom u masi materijala, a ne na njegovoj površini. Cijepanje polimernog lanca odvija se prvenstveno u amorfnim područjima. Iako većina objavljenih radova sugerira da će povećanje kristalnosti polimera smanjiti stupanj razgradnje polimera, ipak drugi istraživači<sup>31</sup> izvješćuju o ubrzanoj razgradnji s povećanjem kristalnosti polimera. Formiranje oligomera poli(mliječne kiseline), koji nastaju cijepanjem lanca, povećava koncentraciju krajnjih skupina karboksilne kiseline u mediju za razgradnju. Poznato je da te skupine djeluju katalitički, čineći hidrolitičku razgradnju PLA autokatalitičkim i samoodržavajućim procesom.

## 4.2 Promjena mase uzoraka

Tijekom eksperimenta praćena je i promjena mase uzoraka prije i nakon hidrolitičke razgradnje. Kako bi se utvrdilo dolazi li do promjene mase tijekom različitih vremenskih perioda hidrolitičke razgradnje tehničkog-PLA, prah-PLA i filament-PLA u PBS otopini, uzorci su vađeni periodički nakon 2., 4., 6. i 8. tjedna, isprani destiliranom vodom, sušeni 7 dana na 37 °C i vagani. Dugotrajan proces sušenja bio je potreban kako bi se osigurao potpun izlazak vode koja je ušla u uzorak. Promjena mase određena je prema izrazu (1)

$$PM = \frac{(m_t - m_0)}{m_0} * 100 \quad (1)$$

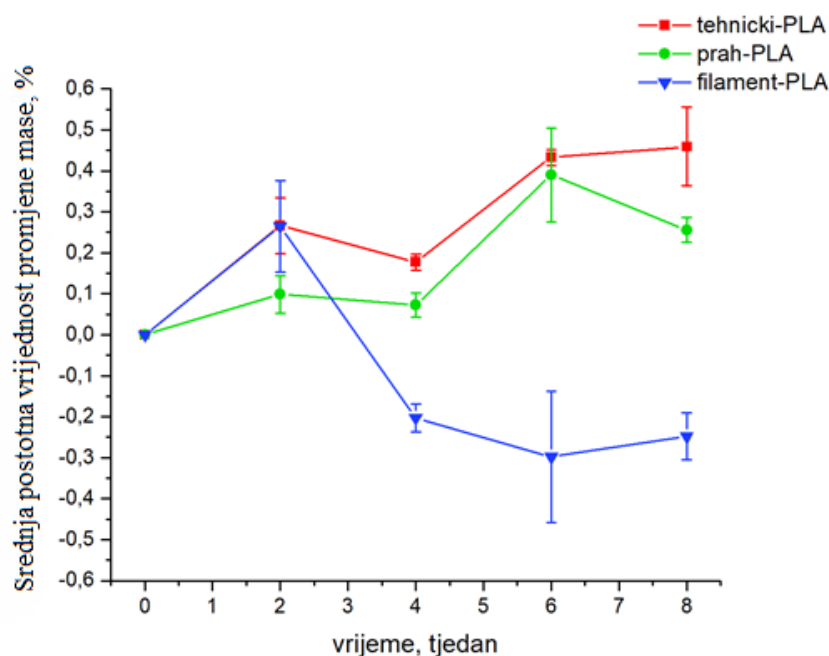
gdje je: PM – srednja postotna promjena mase u usporedbi s početnom masom, %

$m_0$  – početna masa, mg

$m_t$  – masa nakon vremena t, mg

Tijekom procesa razgradnje, molekulska masa polimernih molekula postupno se smanjuje. Međutim, gubitak mase uzorka postaje vidljiv tek kada molekulska masa padne ispod određene granice. Na toj granici oligomeri, manji molekulski fragmenti nastali razgradnjom, postaju dovoljno mali da mogu difundirati, odnosno izlaziti iz strukture materijala. Drugim riječima, stvarni gubitak mase primjećuje se kada se molekule razgrade do te mjere da mogu napustiti čvrstu matricu uzorka. Na *Slici 21.* prikazani su rezultati srednje postotne promjene mase tehničkog-PLA, prah-PLA i filament-PLA, u usporedbi s početnom masom uzorka, u

ovisnosti o vremenu hidrolitičke razgradnje u PBS otopini. Rezultati ne ukazuju na značajan gubitak mase svih polimernih matrica u vremenu od 8 tjedana hidrolitičke razgradnje. Neznatna promjena mase uzoraka ukazuje na sporu razgradnju.



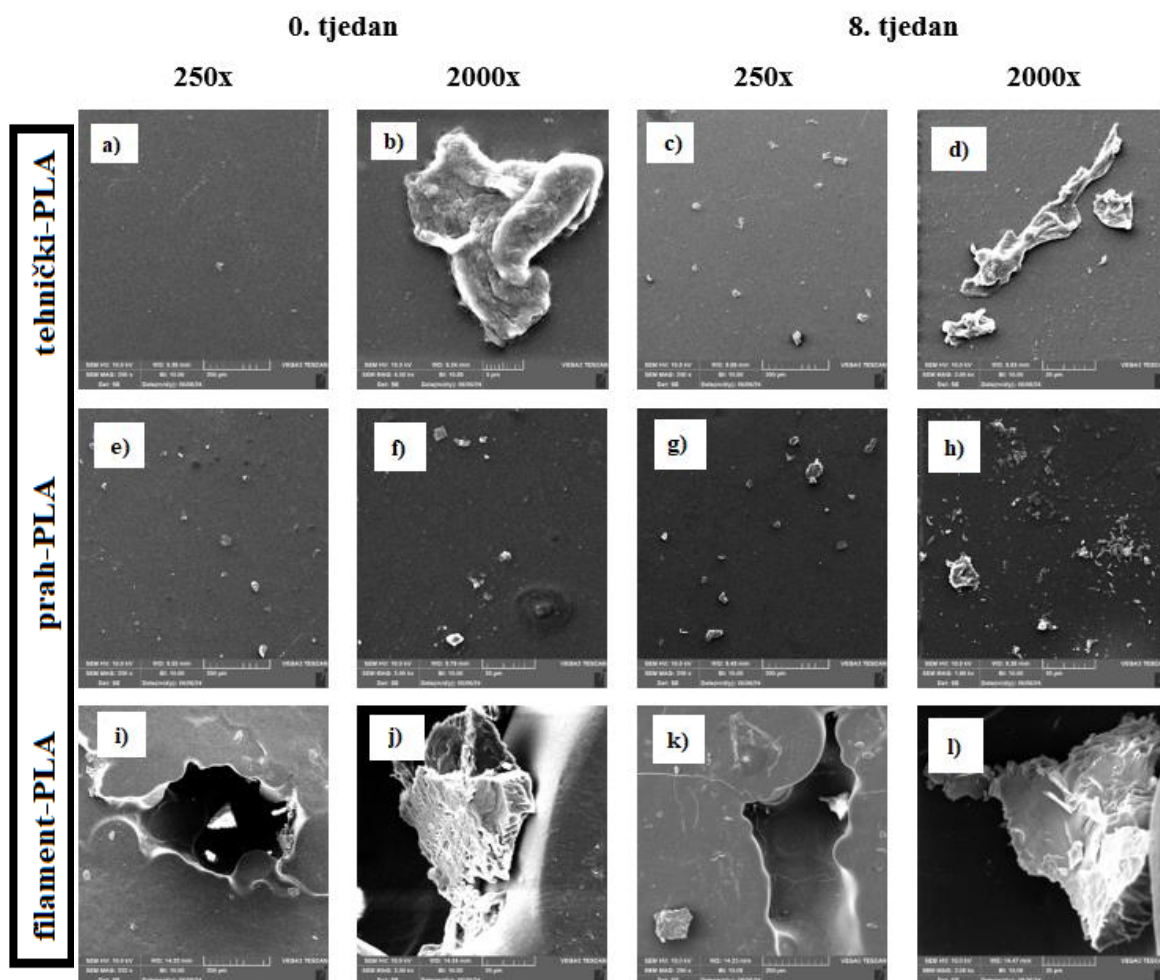
Slika 21. Ovisnost srednje postotne vrijednosti promjene mase uzorka, o vremenu hidrolitičke razgradnje

Prema grafičkom prikazu moguće je zaključiti kako uzorci tehničkog-PLA i prah-PLA u PBS otopini tijekom 2. i 4. tjedna zadržavaju masu, a tijekom daljnje razgradnje pokazuju blagu tendenciju dobivanja mase. Blago povećanje mase uzoraka može se objasniti taloženjem anorganskih soli iz pufera, koji je kontinuirano zamjenjivan. Također, važno je napomenuti da je prah-PLA bio proziran prije razgradnje, dok je nakon razgradnje postao bijel. Ova promjena boje ukazuje na difuziju vode u unutrašnjost polimera i promjenu njegove strukture. Nakon razgradnje i sušenja, uzorci prah-PLA ponovno su postali prozirni, što sugerira da je isparavanje vode vratilo uzorak u njegovo izvorno stanje. Vrijednost postotne promjene mase za uzorak filament-PLA pokazuje najveći gubitak mase između 2. i 4. tjedna razgradnje. Međutim, u sljedećim tjednima dolazi do stabilizacije tih vrijednosti i prisutnosti velike devijacije, zbog čega nije moguće pouzdano komentirati dobivene rezultate.<sup>32-35</sup>



### 4.3 Analiza mikrostrukture

Da bi se odredila morfološka struktura i mikrostruktura uzoraka provedena je SEM analiza. Na *Slici 22.* prikazane su površine ispitanih uzoraka prije razgradnje i nakon provedene hidrolitičke razgradnje pri dva različita povećanja (250 i 2000).



*Slika 22. SEM morfologije površine uzoraka tehnički-PLA, prah-PLA i filament-PLA prije (0. tjedan) i nakon hidrolitičke razgradnje (8. tjedan) pri povećanjima od 250× i 2000×.*

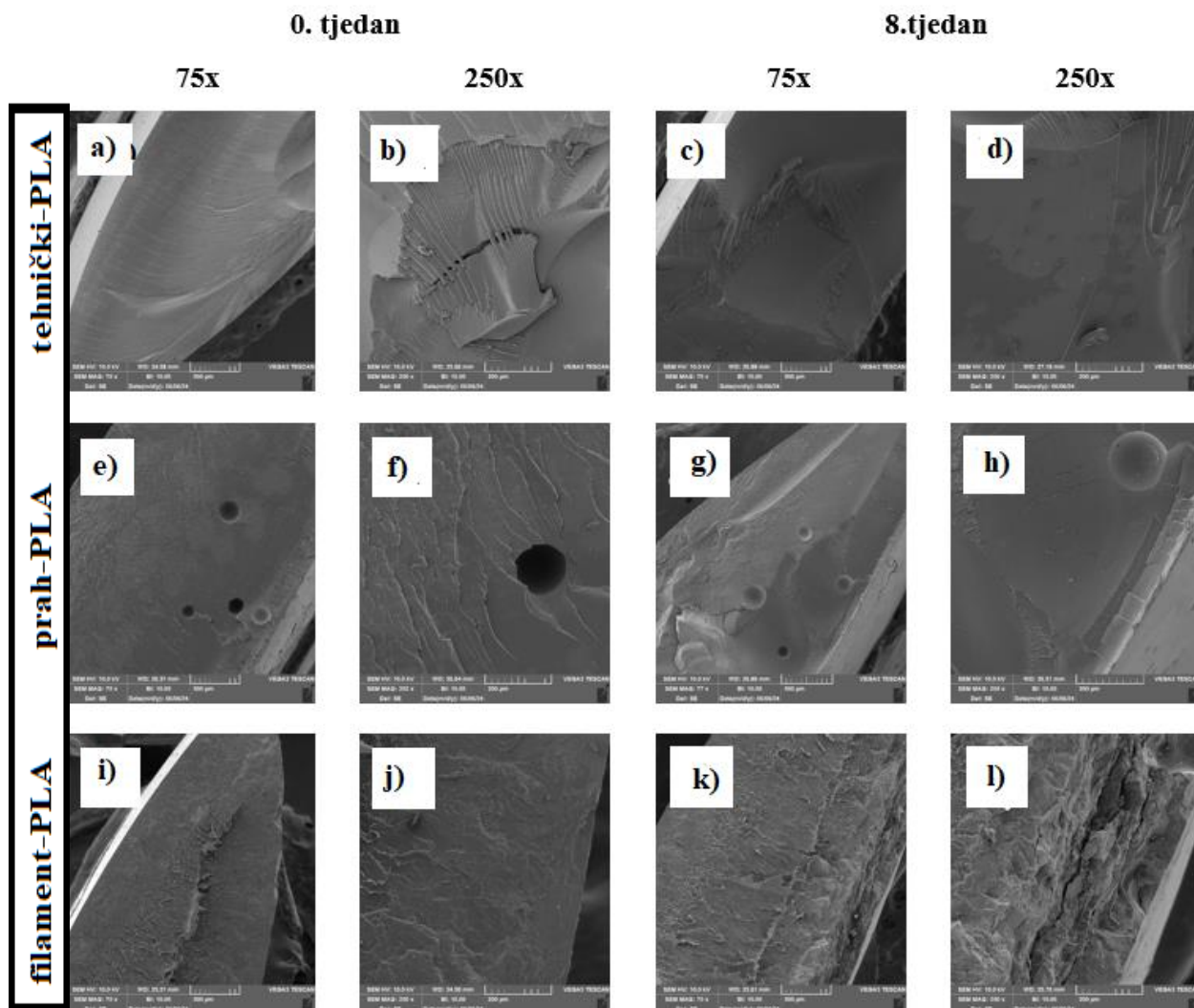
SEM analiza može otkriti gubitak integriteta površine s vremenom, pri čemu površina postaje grublja i nepravilnija. Manje čestice i fragmenti materijala mogu biti vidljivi na površini. Manji fragmenti koji nastaju tijekom razgradnje mogu se agregirati i stvarati nakupine na površini. SEM snimke mogu pokazivati ove agregate kao guste nakupine čestica. Na SEM mikrografiji površine tehničkog-PLA vidljiva je glatka i ujednačena površina, što ukazuje na homogenu strukturu materijala (*Slika 22a,b*). Nakon hidrolitičke razgradnje površina

tehničkog-PLA ostaje i dalje ravna i glatka površina s nešto više sitnijih agregata čestica koji pripadaju samom polimeru što je potvrđeno EDS analizom. (Slika 22.c,d).

Prije hidrolitičke razgradnje kod prah-PLA površina je glatka s nešto sitnih agregata čestica. (Slika 22.e,f) Nakon hidrolitičke razgradnje, prema SEM mikrografijama, površina je glatka, ali u usporedbi s tehničkim-PLA pokazuje određenu nehomogenost.

Filament-PLA vizualno pokazuju znakove značajne degradacije, posebno duž rubova. Prije same degradacije (Slici 22. i,j), uočava se šupljina koja je posljedica procesa pripreme uzorka. Tijekom procesa taljenja filameta, umjesto da se postigne homogena masa, zrak se zadržao unutar materijala, što je rezultiralo formiranjem spomenute šupljine koja na rubovima završava tankim polimernim filmom (Slika 22. i). Nakon degradacije rubovi šupljina postaju mekši (Slika 22. k), što ukazuje da je došlo do površinske degradacije najtanjeg djela uzorka. Površina prije razgradnje je glatka kao i kod prethodnih uzoraka. Nakon degradacije, uočeni su agregati čestica polimera. Kod procesa degradacije filament-PLA materijala, različite strukturne karakteristike igraju ključnu ulogu u njegovoj otpornosti i oblikovanju nakon izloženosti vanjskim utjecajima.<sup>36,37</sup>

Osim površinske analize uzoraka, analiziraju se i presjeci loma uzoraka. Na Slici 23. prikazani su presjeci loma uzoraka pri dva različita povećanja ( $75\times$  i  $250\times$ ). Za dobivanje čistog presjeka uzorak je potrebno prelomiti. Rezanje uzoraka bi uzrokovalo deformaciju presjeka.



*Slika 23. SEM mikrografije lomljenog presjeka uzoraka tehničkog-PLA, prah-PLA i filament-PLA, prije (0. tjedan) i nakon hidrolitičke razgradnje (8. tjedan) pri povećanjima od 75× i 250×*

Prema *Slici 23*, površina loma svih uzoraka pokazuje glatku i ravnu strukturu. Ovo ukazuje na ujednačena svojstva materijala kroz masu uzorka prije početka degradacije. Kod prah-PLA, u presjeku loma materijala (*Slika 23. e, f*), uočavaju se mjehurići zraka koji su posljedica pripreme uzorka. Bez obzira na početno glatku površinu, različiti uzorci mogu pokazati varijacije u otpornosti na degradaciju, ovisno o njihovoj mikrostrukturi.

Uspoređujući ispitane uzorke, rezultati SEM analize pokazuju da je do najveće degradacije došlo kod filament-PLA uzorka. Inicijalno ujednačeni presjek materijala (*Slika 23. i, j*) nakon razgradnje osobito na desnoj strani mikrografija (*Slika 23. k, l*) poprima oblik lističaste strukture. Na istim mikrografijama nakon razgradnje filament-PLA može se primijetiti pojava

sitnih agregata čestica. Tijekom SEM analize provedena je i EDS analiza, koja je pokazala da su agregati u uzorku zapravo istog kemijskog sastava kao i okolni polimer (ugljik i kisik). Ovi agregati predstavljaju nakupine polimernog materijala kao i u ostatku mase uzorka, što ukazuje da to nisu nečistoće ili strane tvari.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu proučena su svojstva tri različita polimerna materijala na temelju PLA tijekom hidrolitičke *in vitro* degradacije u simuliranim biološkim uvjetima u trajanju od 8 tjedana. Ispitivanja su provedena na PLA materijalu tehničke čistoće, amorfnom PLA materijalu medicinske čistoće i kristalastom PLA materijalu medicinske čistoće namijenjenom za primjenu u aditivnoj tehnologiji 3D ispisa. Unutar ispitivanog perioda hidrolitičke razgradnje u simuliranim biološkim uvjetima niti jedan od materijala nije pokazao izrazitu degradaciju i značajan gubitak svojih svojstava. Zbog navedenog, upotrijebljena je kombinacija karakterizacijskih metoda i provedena detaljna analiza kako bi se unutar 8 tjedana, za polimere kratkog perioda razgradnje, uočila promjena svojstava.

Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) pokazali su da se staklište tehničkog-PLA nakon 8 tjedana smanjuje za 8 °C, što je značajno smanjenje u usporedbi sa smanjenjem od 1-2 °C kod uzoraka prah-PLA i filament-PLA. Međutim, materijal zadržava svoju masu i oblik tijekom procesa razgradnje. Analiza pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) otkrila je da površinska struktura i presjek loma tehničkog-PLA ostaju nepromijenjeni prije i poslije hidrolitičke razgradnje. Ovi nalazi sugeriraju da tehnički PLA ima konzistentnu mikrostrukturu, koja nije značajno pogođena procesom hidrolitičke razgradnje, što bi moglo biti korisno za primjene gdje je stabilnost materijala ključna, no zbog prirode tehničkog polimera ovaj materijal nije primjenjiv kada se od biomaterijala zahtjeva medicinska čistoća.

Prah-PLA, medicinske čistoće i amornog karaktera, također zadržava svoju masu i oblik tijekom razgradnje i ne pokazuje značajne promjene staklišta tijekom ispitivanog perioda razgradnje. Odsutnost promjena u  $T_g$  sugerira da materijal ima stabilnu molekulsku strukturu. Prema analizi pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM), površina praha-PLA nakon razgradnje ostaje glatka, ali dolazi do pojave agregata na površini. Iako je primijećena blaga površinska promjena, ona ne utječe na ukupna svojstva materijala, što dodatno potvrđuje njegovu otpornost na hidrolitičku razgradnju. Prah-PLA zahtijeva niže temperature obrade, u usporedbi s kristalastim polimerom, što je važno i poželjno s ekonomskog gledišta.

Filament-PLA pokazuje najveću degradaciju u usporedbi s ostalim uzorcima. Tijekom procesa razgradnje, za razliku od drugih uzoraka, izgubio je homogenost svog presjeka i jedini je

ispitivani uzorak kod kojeg je primijećeno smanjenje mase. Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) pokazali su blagi pad staklišta od 0,9 °C nakon 8 tjedana hidrolitičke razgradnje. SEM mikrografije potvrdile su degradaciju; nakon razgradnje uočeni su agregati čestica i šupljine, koje mogu biti posljedica početne pripreme uzorka. Ove promjene na mikroskopskoj razini upućuju na to da se hidrolitička razgradnja prvenstveno odvija na lako dostupnim površinskim tankim dijelovima materijala, što dovodi do formiranja agregata i povećanja poroznosti. Uzimajući sve ovo u obzir, može se zaključiti da filament-PLA, zbog svoje teže obradivosti, potencijalne sklonosti degradaciji i pojave značajnih promjena u unutarnjoj strukturi, zahtijeva posebnu pozornost kod odabira za specifične primjene npr. za aditivnu proizvodnju poroznih struktura za primjene u biomedicini.

Svi ispitivani materijali temeljeni su na poli(mliječnoj kiselini). Ovim radom se želi ukazati da sastav materijala (polimer i dodaci) i struktura polimera (amorfni ili kristalasti) može bitno utjecati na primjenska svojstva i ponašanje konačnog materijala. Kada se na to dodaju različiti mehanizmi razgradnje te mogućnost pripreme uzoraka različitih dimenzija i poroznosti, vrlo je jasno da razvoj ovakvih biomaterijala zahtijeva značajan i dugotrajan rad.

## 6. LITERATURA

1. Avérous, L., Pollet, E., Environmental Silicate Nano-Biocomposites, Green Energy and Technology, Springer-Verlag, London, 2012, str. 13-28.
2. Doppalapudi, S., Jain, A., Khan, W., Domb, A.J., Biodegradable Polymers- an Overview, Polym. Adv. Technol., 25 (2014) 427-435.
3. Garlotta, D., A Literature Review of Poly(Lactic Acid), J. Environ. Polym. Degrad., vol. 9, 2 (2001) 63-84.
4. Avérous, L., Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications, u: Belgacem, M.N., Gandini, A., Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, Elsevier Ltd., 21 (2008) 433-450.
5. Djukić-Vuković, A., Mladenović, D., Ivanović, J., Pejin, J., Mojović, L., Towards Sustainability of Lactic Acid and Poly-lactic Acid Polymers Production, Renew. Sustain. Energy Rev., 108 (2019) 238-252.
6. Li, G., Zhao, M., Xu, F., Yang, B., Li, X., Meng, X., Teng, L., Sun, F., Li, Y., Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid, Molecules 25 (2020) 1-9.
7. Jamshidian, M., Arab Tehrany, E., Imran, M., Jacquot, M., Desobry, S., Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9 (2010) 554-571.
8. Shaikh, T., Kaur, H., Synthesis and Characterization of Nanosized Polylactic Acid/TiO<sub>2</sub> Particle Brushes by Azeotropic Dehydration Polycondensation of Lactic Acid, J. Polym. Res., 25 (2018) 1-9.
9. Lim, L.T., Auras, R., Rubino, M., Processing Technologies for Poly(Lactic Acid), Prog. Polym. Sci., 33 (2008) 820-582.
10. de Albuquerque, T. L., Marques Jr., J. E., de Queiroz, L. P., Souza Ricardo, A. D., Ponte Rocha, M. V., Polylactic Acid Production From Biotechnological Routes: A Review, Int. J. Biol. Macromol., 186 (2021) 933-951.
11. Castro-Aguirre, E., Iniguez-Franco, F., Samsudin, 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.
12. Fasihah Zaaba, N., Jaafar, M., A Review On Degradation Mechanisms of Polylactic Acid: Hydrolytic, Photodegradative, Microbial, and Enzymatic Degradation, Polym. Eng. Sci., 60 (2020) 2061-2075.

13. Feng, P., Jia, J., Liu, M., Peng, S., Zhao Z., Shuai, C., Degradation Mechanisms and Acceleration Strategies of Poly(Lactic Acid) Scaffold for Bone Regeneration, *Mater. Des.*, 210 (2021) 110066.
14. Peng, B.-Y., Chen, Z., Chen, J., Zhou, X., Wu, W.-M., Zhang, Y., Biodegradation of Polylactic Acid by Yellow Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) via Resource Recovery: A Sustainable Approach for Waste Management, *J. Hazard. Mater.*, 416 (2021) 125803
15. Cui, L., Wang, X., Szarka, G., Hegyesi, N., Wang, Y., Sui, X., Pukanszky, B., Quantitative Analysis of Factors Determining the Enzymatic Degradation of Poly(Lactic Acid), *Int. J. Biol. Macromol.*, 209 (2022) 1703-1709.
16. Elmowafy, E. M., Tiboni, M., Soliman, M.E., Biocompatibility, Biodegradation and Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid)/ Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Micro and Nanoparticles, *J. Pharm. Investig.*, (2019).
17. Akindoyo, J.O., Beg, M. D. H., Ghazali, S., Alam, A. K. M. M., Heim, H. P., Feldmann, M., Synergized Poly(Lactic Acid)- Hydroxyapatite Composites: Biocompatibility Study, *J. Appl. Polym. Sci.*, (2019) 1-10.
18. Hamad, K., Kaseem, M., Yang, H. W., Deri, F., Ko, Y. G., Properties and Medical Applications of Polylactic Acid: A Review, *EXPRESS Polym. Lett.*, vol.9, 5 (2015) 435-455.
19. Kovačić, T., *Struktura i Svojstva Polimera*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilišta u Splitu, 2010., str. 50-70.
20. Šimeg, L., *Primjena Elektronske Mikroskopije u Karakterizaciji Prirodnih Materijala*, Završni rad, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2014.
21. Sloković, I., *Hidrolitička Razgradnja PLA*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2023.
22. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/materials-science/eds-technology.html> (pristupljeno 13.6.2024.)
23. Očelić Bulatović, V., Govorčin Bajsić, E., Kučić Grgić, D., Jozinović, A., Dejanović, I., *Toplinska Svojstva Biorazgradljivih Mješavina PLA/TPS*, *Kemija u Industriji*, 67(13) (2018) 33–42.
24. Grgurić, T. H., *Struktura i Svojstva Materijala*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu.



25. Elsayy, M. A., Kim, K.-H., Park, J.-W., & Deep, A., Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid (PLA) and its Composites, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 79 (2017) 1346–1352.
26. Menczel, J. D., Prime, R. B., Thermal Analysis of Polymers, Fundamentals and Applications, *Mater. Today*, 12 (2009) 46
27. Yasuniwa, M., Tsubakihara, S., Sugimoto, Y., Nakafuku, C., Thermal Analysis of the Double-Melting Behavior of Poly(L-lactic acid), *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 42 (2004) 25–32.
28. Magoń, A., Pyda, M., Study of Crystalline and Amorphous Phases of Biodegradable Poly(Lactic Acid) by Advanced Thermal Analysis. *Polymer*, 50 (2009) 3967–3973.
29. Li, S., Hydrolytic Degradation Characteristics of Aliphatic Polyesters Derived from Lactic and Glycolic Acids, *J. Biomed. Mater. Res.*, 48 (1999) 342–353.
30. Kos, J., Priprema i Karakterizacija PLA/Fibroin Svile Kompozita, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2022.
31. Zhou, Q., Xanthos, M., Nanoclay and Crystallinity Effects on the Hydrolytic Degradation of Poly lactides. *Polym. Degrad. Stab.*, 93 (2008) 1450-1459.
32. Bauer, L.; Rogina, A.; Ivanković, M.; Ivanković, H., Medical-Grade Poly(Lactic Acid)/Hydroxyapatite Composite Films: Thermal and In Vitro Degradation Properties, *Polymers*, 15 (2023) 1512.
33. Stanojević, M., Leskovic, M., Foglar, L. Tarbuk, A., Hidrolitička Razgradnja PCL/PLA Mješavina uz Prisutnost Hidrofilne Komponente, V. hrvatski simpozij o kemiji i tehnologiji makromolekula u funkciji pametne specijalizacije, Zagreb, Hrvatska, 2017., str. 67-78.
34. Höglund, A., Odelius, K., Albertsson, A.-C., Crucial Differences in the Hydrolytic Degradation between Industrial Polylactide and Laboratory-Scale Poly(L-lactide), *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 4 (2012) 2788–2793.
35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8706057/> (pristupljeno 1.7.2024.)
36. Pavišić, S., Utjecaj Modifikacije Površine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na Svojstva PCL i PLA Polimera, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
37. Sinha Ray, S., Bousmina, M., Biodegradable Polymers and Their Layered Silicate Nanocomposites: In Green and Sustainable Chemistry. *Prog. Mater. Sci.*, 50 (2005) 962-1079.