

Utjecaj uvjeta pripreve na svojstva nosača temeljenih na poli(mliječnoj kiselini)

Jerneić, Marta

Undergraduate thesis / Završni 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:734154>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Marta Jerneić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2024

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

Kandidatkinja **Marta Jerneić**

Predala je izrađen završni rad dana: 17. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

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

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

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

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

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 20. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
EKOINŽENJERSTVO

Marta Jerneić

UTJECAJ UVJETA PRIPRAVE NA SVOJSTVA NOSAČA TEMELJENIH NA
POLI(MLIJEČNOJ KISELINI)

Mentorica: prof.dr.sc. Marica Ivanković

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

izv.prof.dr.sc. Anamarija Rogina

prof.dr.sc. Krešimir Košutić

Zagreb, rujan 2024.

Zahvala

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”.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Marici Ivanković na prihvaćenom mentorstvu i ukazanoj mogućnosti suradnje sa Zavodom za fizikalnu kemiju. Veliko hvala mag.ing.cheming. Marini Moniki Marić, na uloženom trudu i vremenu, kao i na suradnji i vođenju ovog završnog rada. Puno hvala i dr.sc. Leonardu Baueru, na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Hvala svima koji su sa mnom dijelili suze i sreću, u prethodne tri godine! Biti će toga, hvala unaprijed!

SAŽETAK

Inženjerstvo koštanog tkiva je multidisciplinarno područje čiji je cilj razviti materijale koji će zamijeniti oštećeno tkivo te potaknuti proces zacjeljivanja kosti. Jedan od potencijalnih sustava za takvu primjenu je kompozit kitozan/hidroksiapatit (CHT/HAp). Međutim njegova loša mehanička svojstva predstavljaju glavni nedostatak za primjene u inženjerstva tkiva. Poli(mliječna kiselina) (PLA) zbog svojih dobrih mehaničkih svojstava pozitivno utječe na svojstva kompozita. Prethodna istraživanja su pokazala da prilikom razvoja sustava PLA/CHT-HAp dolazi do gubitka mase, a samim time i do značajnog gubitka mehaničkih svojstava kompozitnog materijala. Stoga, cilj ovog završnog rada je ispitati utjecaj pojedinog koraka sinteze nosača temeljenog na poli(mliječnoj kiselini). PLA uzorci izloženi su octenoj kiselini i natrijevoj lužini u više vremenskih intervala (1h, 6h, 12h, 24h i 48h), te je ispitan utjecaj liofilizacije u dva vremenska intervala (24h i 48h). Nakon svakog koraka, gravimetrijskom analizom je utvrđen gubitak mase s ciljem određivanja koraka sinteze koji najznačajnije utječe na gubitak mase, te posljedično i gubitak mehaničkih svojstava PLA/CHT-HAp kompozita. Rezultati istraživanja su pokazali da otopina octene kiseline nema značajnog utjecaja na PLA, dok otopina natrijeve lužine ubrzava proces degradacije polimera. Uzorci podvrgnuti utjecaju lužine okarakterizirani su metodom elektronske pretražne mikroskopije (SEM) i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama (FTIR).

Ključne riječi: poli(mliječna kiselina), degradacija, tkivno inženjerstvo

ABSTRACT

Influence of preparation conditions on the properties of poly(lactic acid) based scaffolds

Bone tissue engineering is a multidisciplinary field aimed at developing materials that will replace damaged tissue and stimulate bone healing process. One potential system for such applications is the chitosan/hydroxyapatite (CHT/HAp) composite. Poly(lactic acid) (PLA), due to its good mechanical properties, positively affects the composites characteristic. Previous research has shown that during the development of the PLA/CHT-HAp scaffold, a certain weight loss occurred and consequently, a significant loss of mechanical properties in the composite material was observed. Therefore, the goal of this experimental work is to examine the impact of individual synthesis steps on the properties of the poly(lactic acid) based scaffold. PLA samples were exposed to acetic acid and sodium hydroxide in several time intervals (1h, 6h, 12h, 24h and 48h), and the effect of lyophilization was examined for two time intervals (24h and 48h). After each step, the weight loss was determined by gravimetric analysis to identify the synthesis step that significantly affects weight loss and consequently the loss of mechanical properties of the PLA/CHT-HAp composite. The research results showed that acetic acid solution had no significant effect on PLA, while the sodium hydroxide solution accelerated the polymer degradation process. Samples subjected to the alkaline solution were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Key words: poly(lactic acid), degradation, tissue engineering

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Poli(mliječna kiselina)	2
2.1.1 Svojstva PLA	3
2.1.2 Metode sinteze PLA	3
2.1.3 Razgradnja PLA	5
2.1.3.1 Utjecaj molekulske mase	6
2.1.3.2 Utjecaj temperature	7
2.1.3.3 Utjecaj pH-vrijednosti	8
2.2. 3D tiskani PLA nosači u tkivnom inženjerstvu	9
2.2.1 Važnost mehaničkih svojstava kompozita	10
2.2.2 Priprava kompozitnog materijala	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Uvod	12
3.2. Materijali	12
3.3. Metode ispitivanja	12
3.3.1 Utjecaj kiseline	13
3.3.2 Utjecaj lužine	13
3.3.3 Zajednički utjecaj kiseline i lužine	13
3.3.4 Utjecaj liofilizacije	13
3.4. Karakterizacija materijala	14
3.4.1 Gravimetrijsko određivanje	14
3.4.2. Infracrvena spektrofotometrija s Fourierovim transformacijama	14
3.4.3. Elektronska pretražna mikroskopija	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Gravimetrijska analiza	15
4.1.1 Utjecaj kiseline i lužine	15
4.1.2 Utjecaj liofilizacije	16
4.1.3 Zajednički utjecaj kiseline i lužine	17
4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama	21
4.3. Pretražna elektronska mikroskopija	22
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURA	26

1. UVOD

Kost je heterogeni kompozitni materijal koji se sastoji od organske i anorganske faze. Anorgansku fazu čine većinom kalcij-fosfati u obliku hidroksiapatita (HAp), dok se organska faza sastoji od približno 90 % kolagena tipa I, a ostatak čine nekolagenski proteini, lipidi i voda. Kako bi se liječila oštećenja i bolesti kostiju, inženjerstvo koštanog tkiva se usmjerilo razvoju materijala koji će pomoći u procesu povećanja funkcije oštećenog dijela tkiva, te potaknuti regeneraciju i rast prirodnog koštanog tkiva. Materijali temeljeni na biomimetičkom pristupu posjeduju strukturu i svojstva slična prirodnom koštanom tkivu što omogućuje povećanje vjerojatnosti pozitivnog odgovora organizma uslijed nasađivanja. Kako bi se oponašala organska faza koriste se sintetski (npr. poli(ϵ -kaprolakton), poli(mliječna kiselina), poli(laktično-glikolna) kiselina) i prirodni (npr. alginat, kitozan, kolagen, želatina svila) biorazgradljivi polimeri [1,2,3].

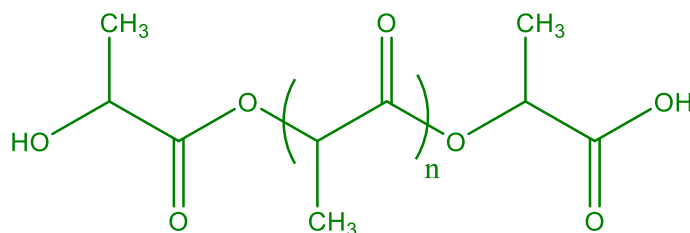
Glavna ograničenja u inženjerstvu koštanog tkiva su loša mehanička svojstva kompozitnih sustava koja sadrže prirodni polimer kao jednu od faza, kao što su trodimenzionalni nosači hidroksiapatita i kitozana. Stoga, kako bi se prevladali mehanički nedostaci biopolimera, korišteni su dodatni sintetski polimeri. Jedan takav sintetski polimer je poli(mliječna kiselina) koji se sa svojim dobrim mehaničkim svojstvima pokazao kao adekvatan polimer za očvršćivanje strukture kompozitnih materijala na bazi prirodnih polimera i hidroksiapatita [2].

Istraživanje koje je prethodilo izradi ovog završnog rada temelji se na 3D tiskanim nosačima poli(mliječne kiseline) impregniranim suspenzijom hidroksiapatita formiranog u otopini kitozana. Dobiveni nosači pokazali su se dobrima za potencijalnu primjenu u tkivnom inženjerstvu, ali jedan od nedostataka bio je značajan gubitak mase PLA nosača. Stoga je cilj ovog završnog rada odrediti koji od koraka obrade materijala tijekom sinteze kompozita utječe na gubitak mase, te postoji li njihov kumulativni učinak na konačna svojstva.

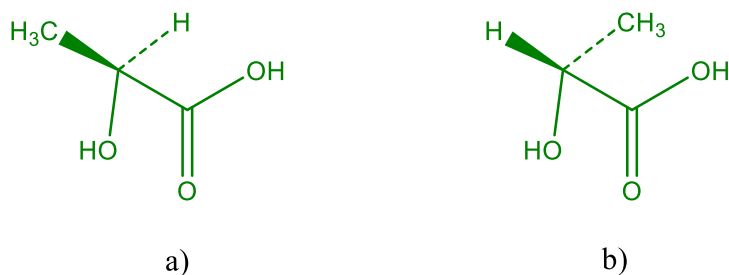
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Poli(mliječna kiselina)

Polimer mliječne kiseline ili polilaktid (PLA) pripada skupini poli- α -hidroksi kiselina odnosno tipu linearnih, alifatskih, plastomernih poliestera. Kemijska struktura PLA prikazana je na slici 1. Polimerizacijom monomera mliječne kiseline (LA) može nastati čista poli – L – LA (PLLA) i čista poli – D – LA mliječna kiselina (PDLA), kao i stereokompleks poli – D,L – LA (PDLLA). Kiralna molekula LA prikazana je na slici 2. Monomer PLLA čini L-mliječna kiselina, (S)-enantiomer mliječne kiseline. Zbog ponavljajućeg čistog L-izomera visoke je kristalnosti, dobrih mehaničkih svojstava i visoke temperature taljenja (170°C - 180°C). U usporedbi s amorfnim oblicima PLA, optički čista PLLA, kao i PDLA sporije se razgrađuje zbog svoje kristalnosti. PDLA se sastoji od D-mliječne kiseline, (R)-enantiomera te je zrcalna slika PLLA. Također je zbog ponavljajućeg čistog D-izomera visoke kristalne strukture, dobrih mehaničkih svojstava i visoke temperature taljenja. Racemična smjesa, PDLLA dobiva se sintezom iz L- i D- izomera, manjeg je stupnja kristalnosti te joj je razgradnja brža nego što je to kod PLLA i PDLA [4].



Slika 1. Prikaz strukture poli(mliječne kiseline)



Slika 2. Strukturni prikaz optičkih izomera (a) L(+)- i (b) D(-)- mliječne kiseline

2.1.1 Svojstva PLA

Poli(mliječna kiselina) kristalasti je polimer, pogodan za primjenu u biomedicinske svrhe zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i dobrih mehaničkih svojstava. Fizikalna, mehanička i toplinska svojstva poli(mliječne kiseline), kao i mogućnost biorazgradnje usko su povezani s primarnom kemijskom strukturom PLA [4]. Stoga, kako bi navedena svojstva bila zadovoljena, sinteza PLA za biomedicinske svrhe se češće provodi pomoću L-izomera, ali zbog visoke kristalnosti i dugog vremena razgradnje kombinira se s D,L-mliječnom kiselinom.

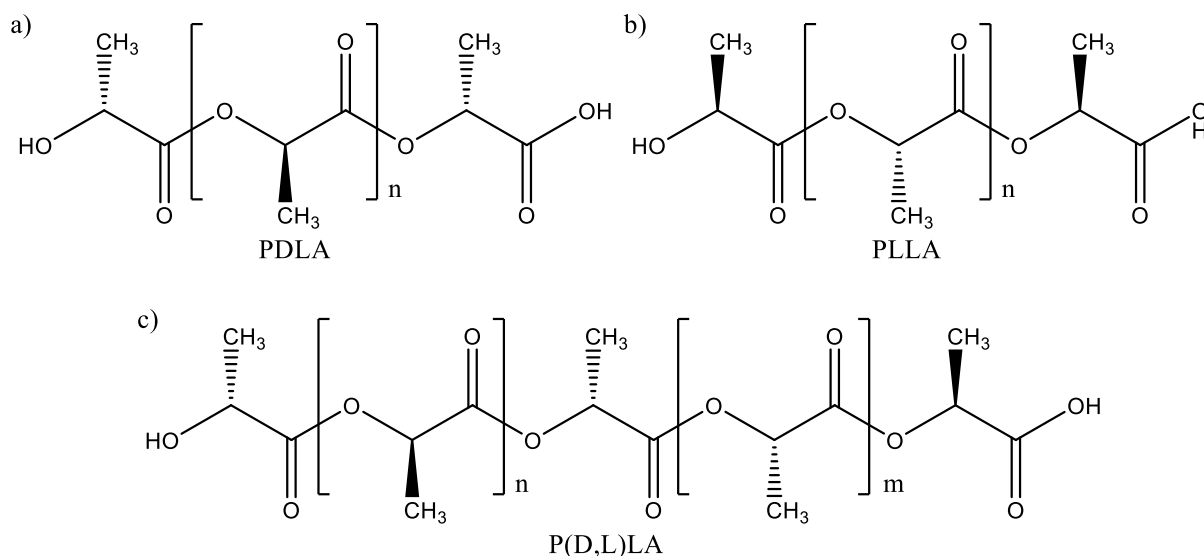
Zahvaljujući kristalastom obliku, vlačnoj čvrstoći i elastičnosti, PLA posjeduje dobra mehanička svojstva. O stupnju kristalnosti ovisi brzina degradacije, kao i tvrdoća, čvrstoća, vlačna čvrstoća i žilavost. Molekulska masa također je uvjet dobrih mehaničkih svojstava jer visoka molekulska masa osigurava željenu čvrstoću kompozita [5]. Dobra mehanička svojstva kao što su tvrdoća, čvrstoća i žilavost nužna su svojstva PLA za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Nosači za ovu primjenu moraju moći zadržati svoj oblik i pružati mehaničku potporu tkivu. Također, nosačima je potrebna i odgovarajuća čvrstoća i vlačna čvrstoća koja će biti jednakih vrijednosti kao kod tkiva kojima služe kao potporna struktura. Dobra mehanička svojstva PLA je potrebno sačuvati tijekom pripreme kompozita kako ne bi došlo do deformacija ili pucanja prilikom augmentacije, te kako bi se osigurala postupna degradacija što će osigurati postupnu formaciju novog tkiva [6,7].

2.1.2 Metode sinteze PLA

Mliječna kiselina (2-hidroksipropionska kiselina), monomer poli(mliječne kiseline) organska je kiselina koja se tradicionalno proizvodi fermentacijom šećera dobivenih iz obnovljivih izvora, ali mliječna kiselina može biti proizvedena i kemijskom sintezom. LA se prirodno nalazi u biljkama, mikroorganizmima i životinjama, te iako se može proizvesti kemijskom sintezom, najveći je se udio proizvede fermentacijom ugljikohidrata, primjerice iz šećerne trske i šećerne repe. Zbog ograničenja kod kemijske sinteze kao što su visoki proizvodni troškovi, ograničeni kapaciteti te nemogućnosti dobivanja čistih enantiomera, najviše se proizvodi prirodnim putem [8]. Kao produkt kemijske sinteze mliječne kiseline, uvijek se dobiva racemična smjesa L- i D- mliječne kiseline, što je veliki nedostatak pred postupkom fermentacije kojim se proizvede optički čista L- ili D- mliječna kiselina [9].

Poli(mliječna kiselina) se iz mliječne kiseline može sintetizirati koristeći nekoliko metoda, uključujući izravnu kondenzacijsku polimerizaciju, azeotropnu dehidracijsku kondenzaciju i polimerizaciju otvaranjem prstena laktida. Izravna kondenzacijska polimerizacija mliječne kiseline uglavnom se provodi u talini destilacijom kondenzacijske vode, s ili bez prisutnosti katalizatora. Reakcija može biti katalizirana titanijem, kositrom ili cinkom te se za postizanje visoke konverzije provodi produženim vremenom reakcije (40 – 100 h). Pri ovoj metodi kao sekundarni produkt nastaje voda koja hidrolizira dobiveni polimer što smanjuje njegovu molekularnu masu. Stoga, nedostatak ove metode je reverzibilnost kondenzacijske reakcije odnosno što za svaku molekulu mliječne kiseline koja se podvrgne reakciji kondenzacije, dolazi do oslobađanja ekvivalentne količine vode koja reagira s produktima. Posljedično je konačna molekularna masa PLA dobivena metodom izravne kondenzacijske polimerizacije određena učinkovitošću odabrane dehidracijske metode. Još jedna od metoda dobivanja PLA je metoda azeotropne destilacije kojom je moguće dobiti polimer više molekulske mase s kraćim vremenom reakcije u usporedbi s kondenzacijom u talini. Dvije spomenute metode nije moguće kontrolirati stereoregularnost polimera što ih čini nepogodnim metodama za dobivanje PLA određenih svojstava za primjenu u biomedicinske svrhe [6,9,10].

Metoda za dobivanje visoko molekularne PLA koja se najčešće primjenjuje je polimerizacija otvaranjem prstena laktida, cikličkog dimera mliječne kiseline. Ova vrsta polimerizacije je lančano-rastuća te se tipično odvija uz prisutnost katalizatora. Sastoji se od tri koraka: polikondenzacije, depolimerizacije i polimerizacije otvaranjem prstena. Ova metoda zahtijeva dodatne korake pročišćavanja koji su relativno složeni i skupi, no kako kod ove metode ne dolazi do oslobađanja ekvivalentne količine vode nakon svakog ulaska laktida u reakciju ima prednost pred izravnom kondenzacijskom polimerizacijom. Ovom metodom moguće je dobiti stereoregularni oblik PLA, kao i polimer visoke molekulske mase kontroliranjem uvjeta provedbe sinteze kao što su vrijeme zadržavanja reakcijske smjese i temperature u kombinaciji s vrstom i koncentracijom katalizatora [6]. Stereoregularni oblici PLA su prikazani na slici 3.



Slika 3. Stereoregularni oblici PLA: (a) poli-(D)-mliječna kiselina; (b) poli-(L)-mliječna kiselina; (c) kopolimer P(DL)LA s jednakim udjelima L i D jedinica

PLA može kristalizirati ovisno o udjelu optički aktivnih L- i D- enantiomera u tri oblika – α , β i γ . Koji će kristal optički čistih PLA kristalizirati ovisi o uvjetima kristalizacije odnosno temperaturi pri kojoj se proces odvija. Pri uvjetima temperature taljenja od 100°C do 120°C, dobivaju se kristali α - oblika dok se β - kristali dobivaju na temperaturi taljenja nižoj za oko 10°C od α -kristala. Za razliku od PLLA i PDLA, kristalna ćelija stereokompleksa sadrži jedan PLLA i jedan PDLA lanac te je njegovo talište za oko 50°C više od tališta PLA monokristala [10]. Optička čistoća ključna je u određivanju fizikalnih svojstava PLA jer male količine drugih enantiomernih nečistoća mogu značajno promijeniti svojstva PLA [11].

2.1.3 Razgradnja PLA

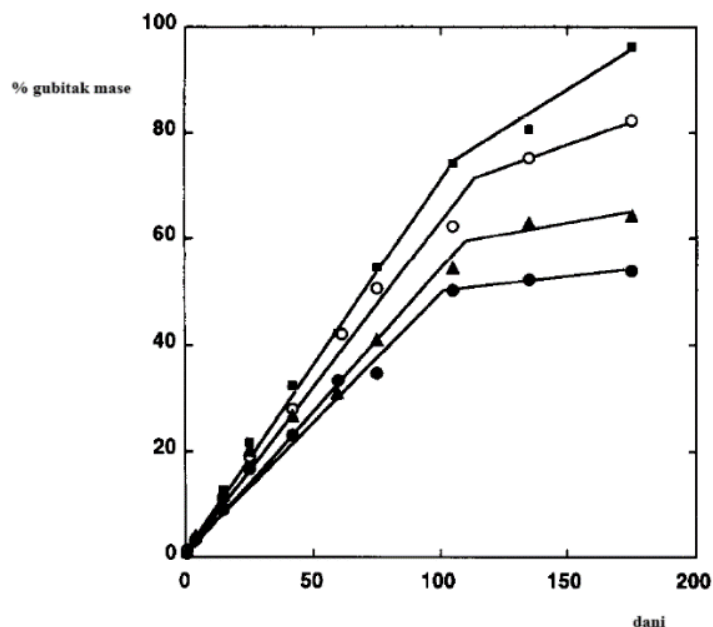
PLA se hidrolitički razgrađuje do mliječne kiseline koja metabolizira ciklusom limunske kiseline, a kao konačni produkti razgradnje nastaju ugljikov dioksid i voda [13]. Kontrola hidrolitičke razgradnje temelj je za medicinsku primjenu. Idealni nosač za regeneraciju kostiju bi se trebao razgraditi jednakom brzinom kojom nastaje novo tkivo. Ako je brzina razgradnje veća od brzina regeneracije, nosač neće moći pružati potporu tkivu domaćina i regeneracija neće biti učinkovita [14]. Hidroliza PLA određena je s nekoliko varijabli, uključujući kemijski sastav, stereokemiju, raspodjelu ponavljajućih jedinica, molekulsku masu, morfologiju uzorka, orijentaciju lanca i uvjete razgradnje [3]. U literaturi je

poznato da je brzina razgradnje poli(α -hidroksi kiselina) određena brzinom difuzije vode, ali i koncentracijom OH⁻ iona koji kataliziraju hidrolizu esterskih veza znatno izraženije nego H⁺ ioni pri sobnoj temperaturi [15].

Prema literaturi postoje dva puta erozije polimera: erozija unutar mase i površinska erozija. Erozija unutar mase nastaje kada je difuzija vode brža od razgradnje polimera što dovodi do homogene razgradnje PLA. Kod površinske erozije, PLA erodira s vanjske strane, a fronta erozije se pomiče prema unutrašnjosti. U ovom je slučaju razgradnja polimera brža od difuzije vode, te dolazi do erozije površine. To znači da, deblji uzorci ne primaju dovoljno vode u unutarnjim dijelovima, te samo površina uzorka prolazi kroz hidrolizu. S druge strane, ako su uzorci tanki, voda je ravnomjerno raspoređena unutar uzorka, kao i hidrolitička razgradnja. U tom slučaju, dolazi do erozije unutar mase [14].

2.1.3.1 *Utjecaj molekulske mase*

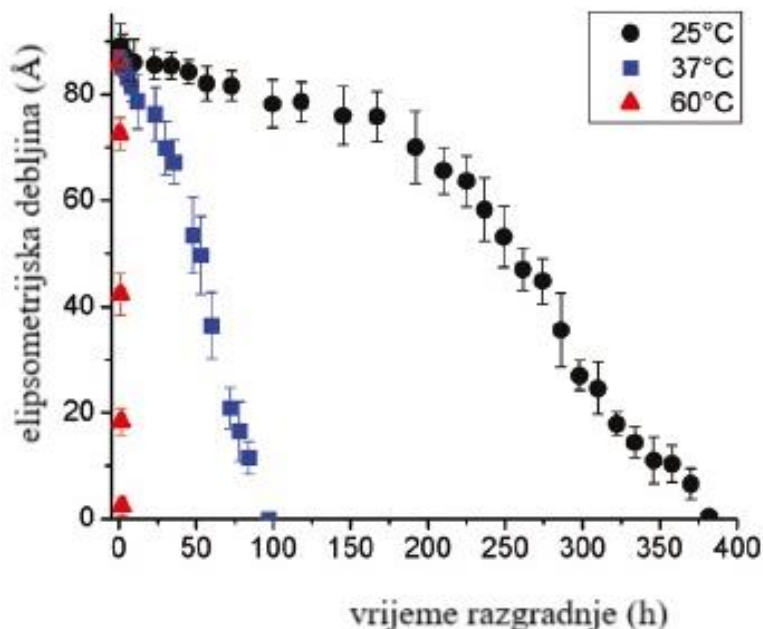
Cam i suradnici proveli su istraživanje utjecaja molekulske mase i morfologije PLA na hidrolitičku razgradnju. Razgradnja filmova provedena je na 37°C u 0,01 mol dm⁻³ otopini NaOH. Ovaj je medij korišten za ubrzanje hidrolize PLLA kako se smatra da razgradnja poli(α -hidroksi kiselina) prvenstveno ovisi o hidrolizi kataliziranoj – OH ionima. Koncentracija od 0,01 mol dm⁻³ NaOH odabrana je kako bi se omogućilo dovoljno vremena da se razgrađeni polimer potencijalno kristalizira, a temperatura medija za razgradnju održavana je na 37°C kako bi toplinski uvjeti bili isti kao u biološkom okruženju. Dobiveni podaci su prikazani na slici 4. Primijećen je ubrzan gubitak mase nakon što je uzorak polimera došao u kontakt s alkalnim medijem. Linearni gubitak mase u ovom istraživanju ukazuje da degradirani uzorci posjeduju kanale koji omogućuju da produkti hidrolize odmah napuste polimernu matricu. Vjerojatno je da je dovoljno visoka koncentracija –OH iona bila homogeno raspoređena kroz cijeli presjek uzorka od početka hidrolize. Za svaki uzorak, primijećena je smanjena brzina gubitka mase nakon 100 dana razgradnje, što se objašnjava dvofaznom mikrostrukturom PLLA filmova. Cijepanje glavnih lanaca započinje cijepanjem esterskih veza prisutnih u amorfnoj fazi cijelog uzorka i postupno se nastavlja sve dok amorfna faze u uzorku više gotovo ni nema. Nakon toga brzina hidrolize značajno opada jer daljnja razgradnja može nastati samo u kristalnoj fazi. Ako je to slučaj, gubitak mase nakon završetka brze reakcije trebao bi ovisiti o stupnju kristalnosti početnog filma, osim ako se kristalna područja ne promijene tijekom razgradnje. Dobiveni rezultati sugeriraju da je dio amorfne faze prošao kroz kristalizaciju tijekom razgradnje [15].



Slika 4. Postotak gubitka mase u odnosu na vrijeme razgradnje filmova PLLA različitih molekulskih masa [15]

2.1.3.2 Utjecaj temperature

Učinak temperature ispitali su Xu i suradnici razgradnjom četkastog PLA dobivenog polimerizacijom otvaranjem prstena laktida u fosfatnom puferu, pH-vrijednosti 7,4, na različitim temperaturama. Debljine „četkica“ praćene su kao funkcija vremena razgradnje i prikazane su na slici 5. Uočeno je da viša temperatura dovodi do brže razgradnje, te da brzina razgradnje značajno ovisi o temperaturi. Povećanje temperature za samo 12°C značajno ubrzava proces razgradnje [16]. Povećanjem temperature dolazi do ubrzanja hidrolize odnosno cijepanje esterskih veza polimera osjetljivo je na promjenu temperature. Također, na višim temperaturama, molekule imaju veću vrijednost kinetičke energije što dozvoljava molekulama vode lakše prodiranje u polimernu matricu [14,17].



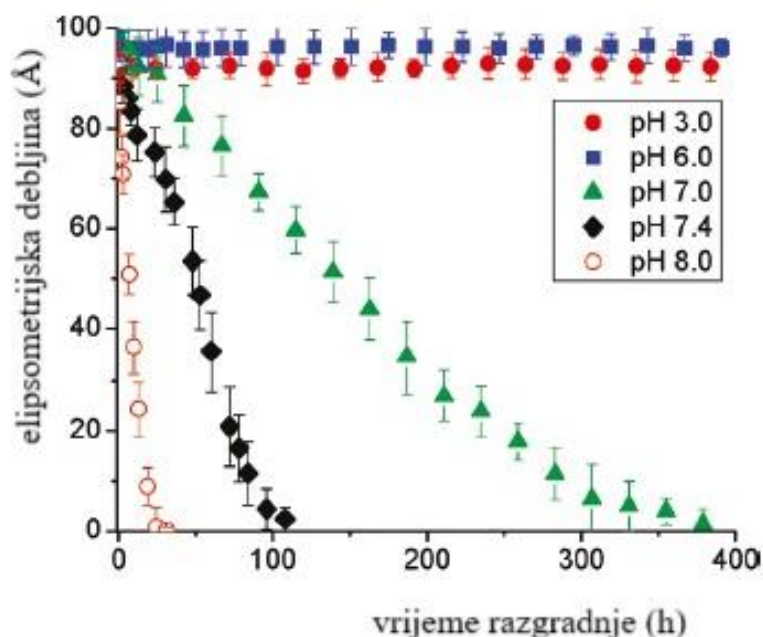
Slika 5. Grafički prikaz elipsometrijske debljine četkastog PLA u ovisnosti o vremenu razgradnje [16]

2.1.3.3 Utjecaj pH-vrijednosti

Na razgradnju PLA, pH ima vrlo snažan utjecaj jer djeluje na mehanizam reakcije i na kinetiku reakcije. Zabilježena su dva glavna mehanizma koja ovise o prirodi medija. U kiselim medijima prevladava hidroliza esterskih veza katalizirana protonima. Nastajanje oligomera mliječne kiseline, nakon cijepanja lanaca, povećava koncentraciju karboksilnih, kiselinskih završnih skupina u mediju za razgradnju, čineći hidrolitičku razgradnju PLA autokatalitičkim i samoodržavajućim procesom zahvaljujući katalitičkom djelovanju ovih završnih skupina. Često se izvještava da mehanizam hidrolize pri kiselom pH napreduje cijepanjem krajeva lanaca. Pri višim pH-vrijednostima reakcija nije ovisna o duljini lanca i odvija se kroz terminalnu $-OH$ skupinu [16].

Istraživanje učinka pH-vrijednosti na razgradnju, također je provedeno na četkastom PLA dobivenim polimerizacijom otvaranjem prstena laktida gdje je PLA inkubiran u fosfatnom puferu na različitim vrijednostima pri 37°C. Uočeno je kako je razgradnja bila brža pri višim pH-vrijednostima. Četkasti PLA debljine približno 10 nm potpuno je uklonjen za oko 25 h kada je pH otopine iznosila 8,0. Smanjenjem pH-vrijednosti na 7,4 bilo je potrebno oko 100 h da se razgradi uzorak iste debljine. Kada su korišteni kiseli puferi (pH=6,0 i pH=3,0) nije uočena

značajna razgradnja u vremenskom razdoblju od 25 h i 100 h. Dobiveni podaci prikazani su na slici 6. [16]



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti elipsometrijske debljine četkastog PLA o vremenu razgradnje [16]

Elsawy i suradnici ispitivali su razgradnju oligomera D, L – LA pri različitim pH uvjetima (npr. 1,5, 4,5 i 7,4) na 65°C. Brzina hidrolize ovisila je o molekularnoj masi oligomera, kao i o pH i temperaturi medija. Brzina razgradnje pri dvije krajnje pH-vrijednosti (1,5 i 7,4) bila je viša nego pri pH 4,5. Pri kiselim uvjetima je način reakcije bio cijepanje lanaca na krajevima, dok je razgradnja napredovala putem nasumičnog cijepanja estera pri lužnatim uvjetima. Ako se razgradnja odvija iznad staklišta (T_g), javlja se erozija u masi, a ako se odvija ispod te temperature, razgradnja je ograničena na površinu [18].

2.2. 3D tiskani PLA nosači u tkivnom inženjerstvu

Glede primjene u inženjerstvu koštanog tkiva, PLA kompoziti čine nosač koji potiče stanice/tkivo na proliferaciju i osteogenu diferencijaciju. Pacijentima s oštećenom funkcijom organa omogućeno je liječenje vlastitim stanicama uzgojenim na polimenoj potpori odnosno nosaču [19]. Razvoj trokomponentnih kompozita kojeg čine PLA, hidroksiapatit i kitozan temelji se na biomimetičkom pristupu. Nosači u tkivnom inženjerstvu predstavljaju 3D

strukturu koja nalikuje izvanstaničnoj matrici u svrhu fiziološkog rasta stanica i regeneracije tkiva [20]. Za regeneraciju koštanog tkiva nosači moraju biti biokompatibilni, netoksični i biorazgradljivi, s mogućnošću dobivanja različite geometrije i oblika za prijanjanje stanica, migraciju, rast i diferencijaciju. Kombinacija biomaterijala, kao što su kitozan i hidroksiapatit koji oponašaju prirodne komponente, vodi do kompozitnog materijala sa složenom strukturom sličnom prirodnom koštanom tkivu. Kitozan, prirodni aminopolisaharid, proučavan je u svrhu oponašanja anorganske faze kompozita, a u kombinaciji s kitozanskom matricom kalcijevi fosfati (npr. hidroksiapatit) čine bioaktivnu fazu. Brojna su istraživanja potvrdila osteogena svojstva nosača na bazi kitozana i kalcijevih fosfata [3]. Također, brojna istraživanja su provedena u svrhu optimiranja odgovarajućih materijala koja čine kompozit. Stoga, kompozitnom je materijalu dodana poli(mliječna kiselina) (PLA), biorazgradljivi sintetski polimer, odobren od strane Američke uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) kako bi se poboljšala njegova mehanička svojstva. Spajanjem dobrih mehaničkih svojstava strukture poli(mliječne kiseline) s osteoinduktivnim i biorazgradljivim svojstvima poroznog hidrogela kitozan – hidroksiapatit dobiven je trokomponentni sustav koji ispunjava potrebne zahtjeve za nadomjestak koštanog tkiva [2].

Kako bih se omogućila velika poroznost kompozitnog hidrogela, potporna struktura PLA dobiva se tehnikom 3D printanja zbog moguće regulacije veličine promjera pora. Velik promjer pora PLA nosača potreban je kako bi se osigurala visoka međusobna povezanost pora hidrogela za lakšu adheziju i migraciju stanica te nesmetan transport hranjivih tvari i metaboličkog otpada [2]. Međutim, hidrofobnost PLA može smanjiti stanični afinitet u regeneraciji tkiva i povećati mogućnost upalnog procesa. No kada se kombinira s biopolimerima kao što je kitozan, dolazi do poboljšanja svojstava bioaktivnosti i biokompatibilnosti. Kao polisaharidni biopolimer, kitozan ima reaktivne funkcionalne skupine, uključujući amino i hidroksilnu skupinu koje su važne za povećanje hidrofilitnosti s ciljem povećanja prijanjanja stanica [13].

2.2.1 Važnost mehaničkih svojstava kompozita

Mehanička čvrstoća je ključno svojstvo u regeneraciji kostiju, a prvenstveno ovisi o volumenu pora nosača i karakteristikama korištenih materijala. Za nosače koji u svojoj primjeni moraju podnositi opterećenje, mehanička svojstva bi trebala biti takva da uspješno zamijene tvrdo koštano tkivo. Nosači na bazi kitozana ne mogu se koristiti za primjene koje nose opterećenja, već služe kao potpora za osteoblaste u svrhu prijanjanja, proliferacije i

diferencijacije u zrele koštane stanice, proizvodeći mineraliziranu izvanstaničnu matricu. Slaba mehanička svojstva poroznih kompozitnih sustava kitozan-hidroksiapatit su glavni ograničavajući faktori u tkivnom inženjerstvu. Stoga, dobra mehanička svojstva poli(mliječne kiseline) doprinose svojstvima kompozitnog materijala koji potom zadovoljava potrebne zahtjeve za nadomjestak koštanog tkiva [3].

2.2.2 Priprava kompozitnog materijala

Jednu od načina priprave opisanih kompozitnih materijala proveli su Rogina i suradnici [2]. Metoda obuhvaća proces zamrzavanja i geliranja gdje se prvo priprema otopina hidroksiapatita i kitozana. Kitozan u obliku praška, otapa se u octenoj kiselini definiranog udjela, a potom se određena količina hidroksiapatita suspendira u pripremljenoj otopini kitozana. PLA nosač je prije impregnacije otopinom, potrebno potopiti u 96% - tnoj otopini etanola i osušiti. Impregnacija se odvija pod vakuumom, nakon čega se pripremljeni materijal smrzava i potapa u mediju za geliranje, koji se sastoji od vodene otopine natrijeva hidroksida i etanola. Nakon geliranja, nosači se potapaju u otopinu etanola pri sobnoj temperaturi, 24h, a potom suše na zraku, pri atmosferskim uvjetima [2].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uvod

U sklopu istraživanja znanstvenika iz Laboratorija za biomaterijale i tkivno inženjerstvo (LABTI) razvijen je materijal na temelju 3D tiskanog makroporoznog nosača poli(mliječne kiseline) impregniranog suspenzijom hidroksiapatita formiranog *in situ* u otopini kitozana.

Koraci sinteze nosača bez kitozana i hidroksiapatita jesu kontakt PLA s 1 vol % octenom kiselinom u vremenskom intervalu od 1 h. Tada slijedi korak zaleđivanja od 12 h u zamrzivaču, a potom liofilizacija vodene otopine kiseline pri niskom tlaku i temperaturi u trajanju od 48 h. Nakon liofilizacije, PLA se potapa s 0,5 mol dm⁻³ vodene otopine NaOH u vremenskom intervalu od 6h, a potom ispiri s demineraliziranom vodom. Završni korak pripreme nosača je zaleđivanje od 12 h u zamrzivaču i obrada liofilizacijom u trajanju od 48 h. Kitozan je hidrofilna molekula koja se otapa u kiselinama. Stoga, otopina se kitozana priprema otapanjem praškastog kitozana u vodenoj otopini octene kiseline. Hidroksiapatit se otapa u otopini kitozana. Otopina natrijeva hidroksida koristi se u pripremi nosača kao sredstvo za geliranje. Prilikom postupka obrade nosača temeljenog na PLA, primijećen je značajan gubitak mase nosača i promjena mehaničkih svojstava.

3.2. Materijali

Za ispitivanje utjecaja uvjeta pripreme na svojstva nosača temeljenog na poli(mliječnoj kiselini) korištene su sljedeće kemikalije:

- Poli(mliječna kiselina) (PLLA)
- Octena kiselina
- Natrijev hidroksid
- Demineralizirana voda

3.3. Metode ispitivanja

Priprema kompozita je podijeljena na pojedinačne korake kako bi se odredio njihov utjecaj na svojstva kompozita. Osim utjecaja otopine kiseline, otopine lužine i liofilizacije, uzorak je izložen i kombinaciji tih utjecaja kako bi se odredilo postoji li sinergijski učinak na svojstva nosača.

3.3.1 Utjecaj kiseline

Kao medij je korištena 1 vol. % vodena otopina octene kiseline. Pripremljena je serija od 5 uzoraka pod nazivima HAc – 1 h, HAc – 6 h, HAc – 12 h, HAc – 24 h, HAc – 48 h. Svaki je uzorak izvagan i potopljen s 10 ml medija. Uzorci su držani u kontaktu s medijem u različitim vremenskim intervalima od 1h, 6h, 12h, 24h i 48h, na sobnoj temperaturi, nakon čega je octena kiselina uklonjena, a uzorci sušeni na zraku pri atmosferskim uvjetima. Na kraju su se uzorci izvagali.

3.3.2 Utjecaj lužine

Kao medij korištena je $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ vodena otopina natrijeva hidroksida. Pripremljena je serija od 5 uzoraka pod nazivima NaOH – 1 h, NaOH – 6 h, NaOH – 12 h, NaOH – 24 h, NaOH – 48 h. Svaki je uzorak izvagan, a nakon toga potopljen s 10 ml medija. Uzorci su držani u kontaktu s medijem u različitim vremenskim intervalima od 1h, 6h, 12h, 24h i 48h, na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja natrijeve lužine, višestruko su ispirani demineraliziranom vodom, sušeni na zraku i potom ponovno izvagani.

3.3.3 Zajednički utjecaj kiseline i lužine

Kao medij je korištena 1 vol. % vodena otopina octene kiseline i $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ vodena otopina natrijeva hidroksida. Pripremljena je serija od 5 uzoraka pod nazivima HAc – NaOH – 1 h, HAc – NaOH – 6 h, HAc – NaOH – 12 h, HAc – NaOH – 24 h, HAc – NaOH – 48 h. Svaki je uzorak prethodno izvagan, a nakon toga potopljen s 10 ml otopine HAc. Uzorci su držani u kontaktu s HAc u različitim vremenskim intervalima od 1h, 6h, 12h, 24h i 48h, na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja vodene otopine HAc postupak se ponovio s 10 ml vodene otopine NaOH. Nakon uklanjanja NaOH, uzorci su višestruko isprani demineraliziranom vodom, sušeni na zraku te su se potom izvagali.

3.3.4 Utjecaj liofilizacije

Uzorci pripremljeni na opisan način nakon obrade octenom kiselinom i natrijevom lužinom podvrgnuti su procesu liofilizacije u svrhu ispitivanja utjecaja sušenja zamrzavanjem na gubitak mase poli(mliječne kiseline). Uzorci su stavljeni na zamrzavanje u zamrzivač na $-22 \text{ }^{\circ}\text{C}$, u periodu od 12h, nakon čega su preneseni u liofilizator. Uređaj radi pod vakuumom, pri

-100°C. Materijal je u liofilizatoru držan u dva različita vremenska intervala – jedna serija uzoraka 24h, a druga serija 48h. Svi su se uzorci nakon postupka liofilizacije izvagali.

3.4. Karakterizacija materijala

3.4.1 Gravimetrijsko određivanje

Radi određivanja utjecaja obrade na svojstva nosača temeljenog na PLA korištena je gravimetrijska metoda tj. mjerenje mase uzoraka prije i nakon provedbe postupka obrade materijala. Vaganje se provodilo na analitičkog vagi s točnošću od 0,1 mg. Korišten je PLA filament, materijal iz kojeg se 3D tiskanjem dobiva nosač određenog oblika i željenih veličina pora, izrezan na jednake duljine (≈ 1 cm).

3.4.2. Infracrvena spektrofotometrija s Fourierovim transformacijama

Promjena strukture PLA filameta okarakterizirana je infracrvenim spektrofotometrom s Fourierovim transformacijama, Bruker Vertex 70. Infracrveni spektri snimljeni su pri 20°C u mjernom području valnog broja od 4000 do 400 rezolucijom od 4 cm^{-1} i 32 ponavljanja. Kao referentni uzorak koristio se čisti PLA obrađen demineraliziranom vodom. Uzorci podvrgnuti utjecaju kiseline nisu se analizirali FTIR metodom jer nije uočena vidljiva promjena nakon gravimetrijske analize.

3.4.3. Elektronska pretražna mikroskopija

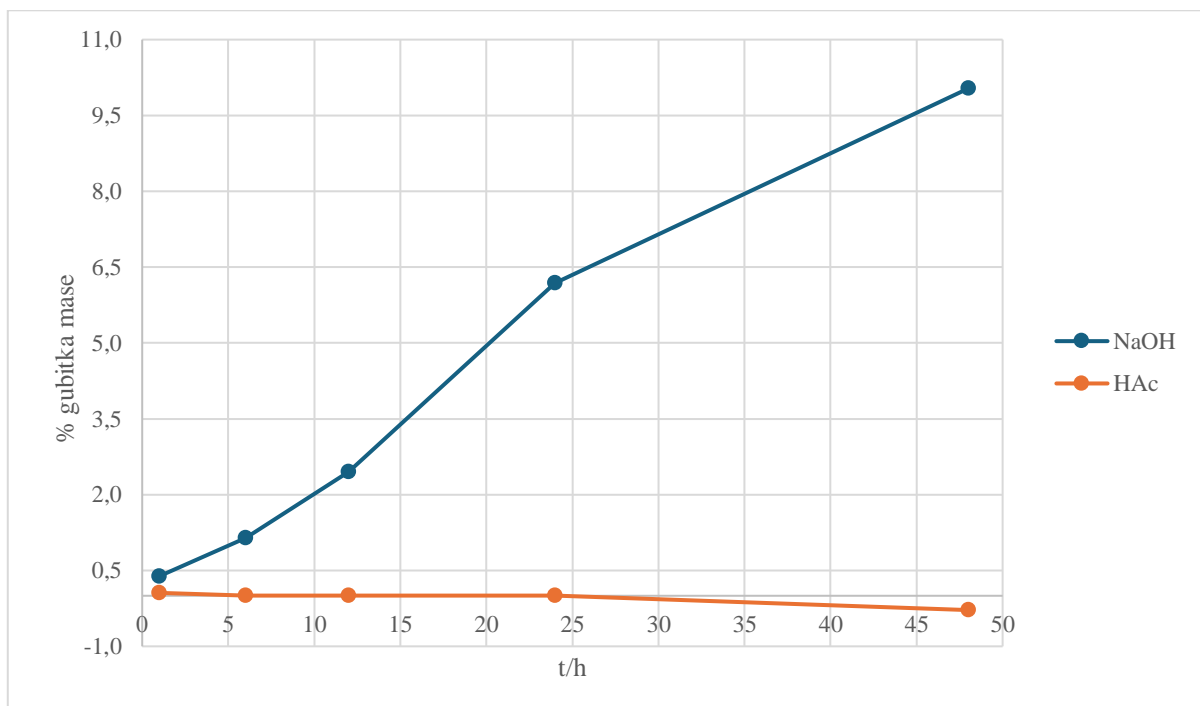
Morfologija PLA filameta kod kojeg je primijećena najveća promjena mase, istražena je elektronskim pretražnim mikroskopom (SEM) TESCAN Vega3SEM Easyprobe. Uzorci su prije početka snimanja napareni zlatom i paladijem u trajanju od 120 s kako bi se materijalima osigurala vodljivost. Uzorci podvrgnuti utjecaju kiseline nisu se analizirali elektronskom pretražnom mikroskopijom, jer nije uočena vidljiva promjena nakon gravimetrijske analize.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Gravimetrijska analiza

4.1.1 Utjecaj kiseline i lužine

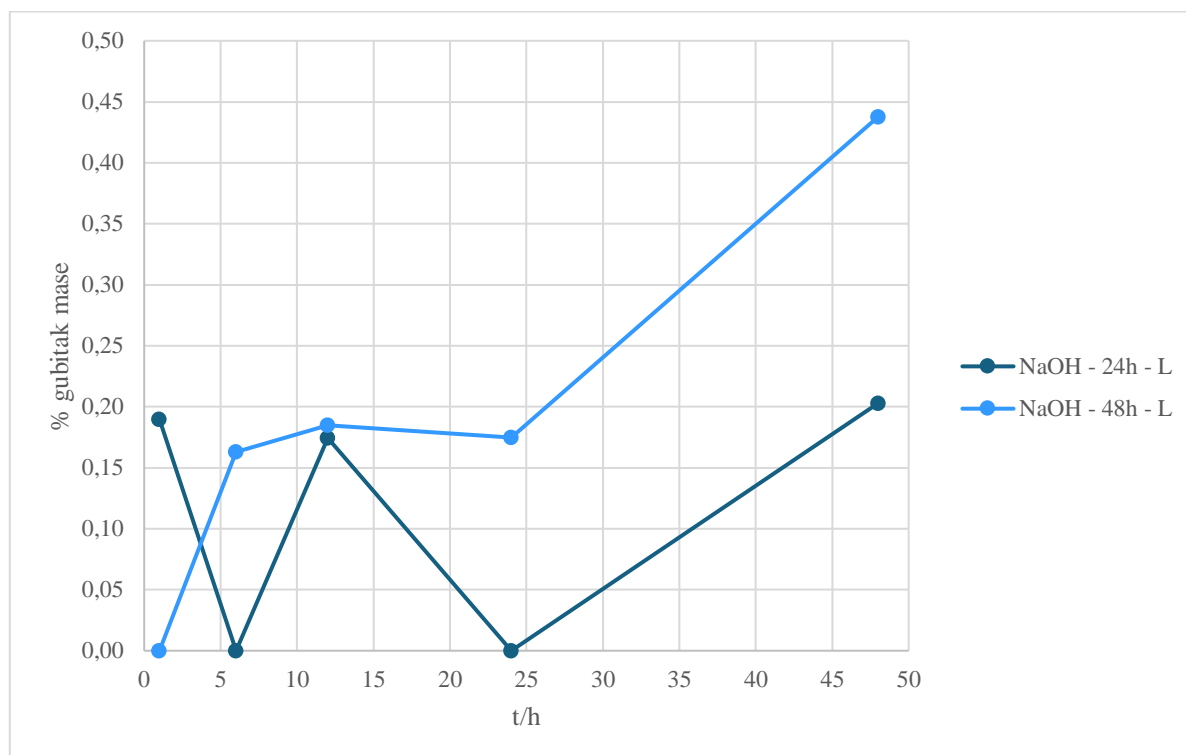
Na slici 7 je vidljivo da obradom uzorka lužinom dolazi do značajnog gubitka mase, dok se obradom kiselinom masa ne mijenja značajno. Vidljivo je neznatno povećanje mase samo jednog uzorka koji je bio u kontaktu s 1 vol % HAc. Usporena razgradnja uzorka nakon 24 h pripisuje se, prema literaturi dvofaznoj mikrostrukтури PLLA odnosno postojanje amorfne i kristalne faze u našim uzorcima. Prvo dolazi do razgradnje amorfne faze, nakon čega slijedi degradacija kristalne strukture [15].



Slika 7. Grafički prikaz gubitka mase u vremenu ispitan na uzorcima podvrgnutim kontaktu s 1 vol % vodenom otopinom HAc i $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH

4.1.2 Utjecaj liofilizacije

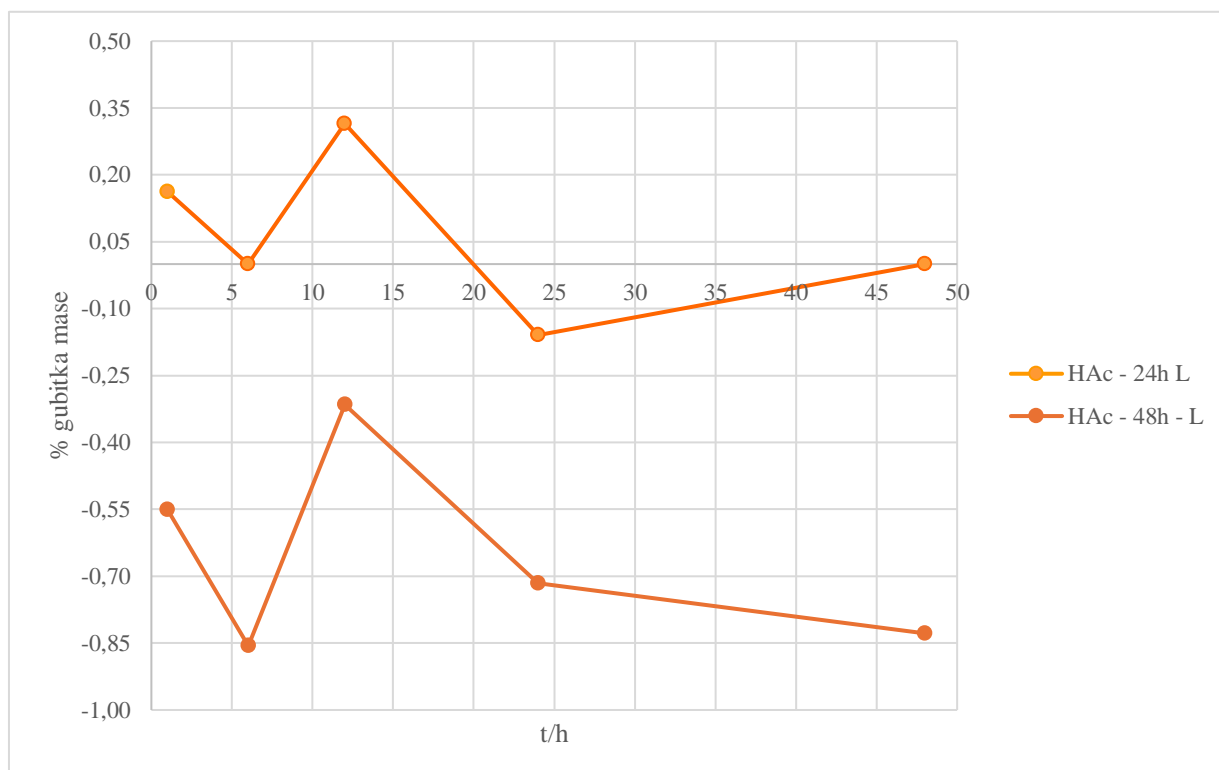
Na slici 8 prikazani su dobiveni rezultati analize utjecaja liofilizacije iz kojih se ne može odrediti trend povećanja/smanjenja mase. Dobiveni raspon vrijednosti postotka (vrijednosti na y-osi) od 0,00 do 0,45% vrlo je malen da bi se mogao interpretirati kao značajnu promjenu mase. Analizom dobivenog može se zaključiti da liofilizacija nema značajnog utjecaja na gubitak mase nosača.



Slika 8. Grafički prikaz utjecaja obrade liofilizacijom na % gubitka mase o vremenu kontakta, ispitan na dvije serije uzoraka obrađene $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ vodenom otopinom NaOH

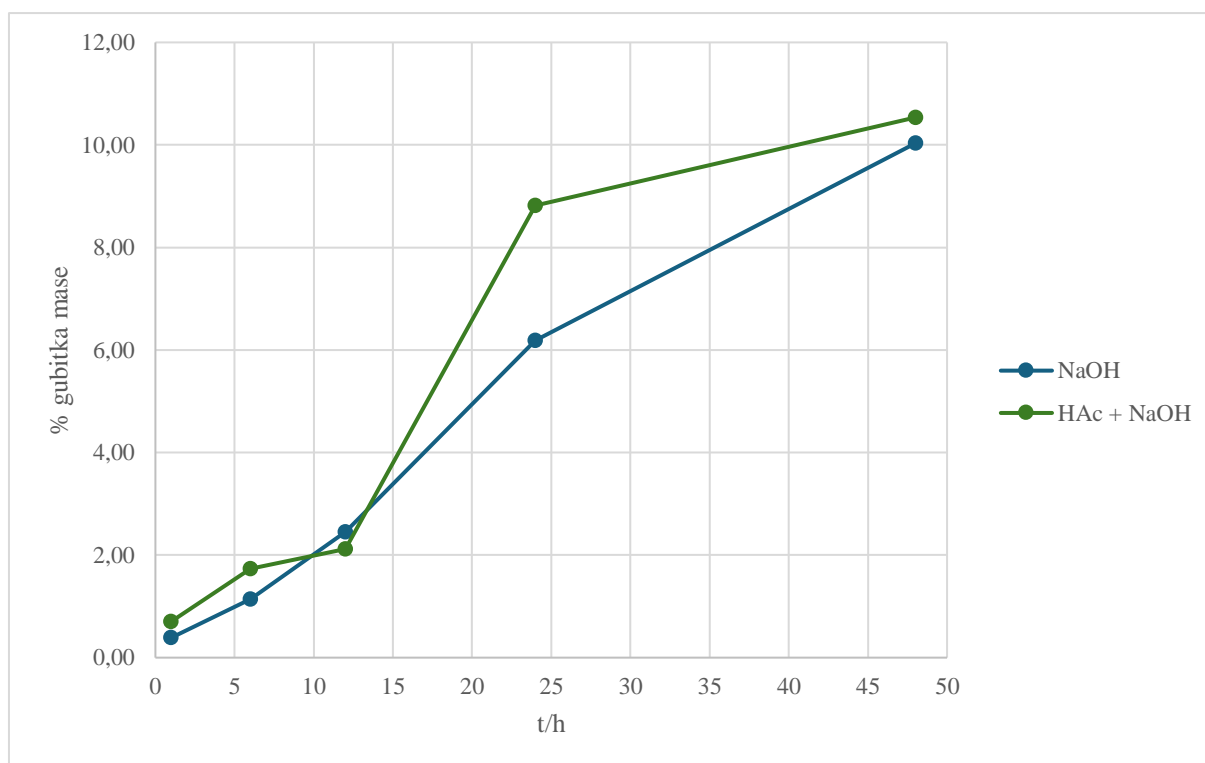
4.1.3 Zajednički utjecaj kiseline i lužine

Na uzorcima obrađenim otopinom kiseline i izloženim uvjetima liofilizacije, uočen je jednak trend promjene mase, no riječ je o vrlo malim promjena u masi, stoga se ne može zaključiti da je riječ o značajnoj promjeni.



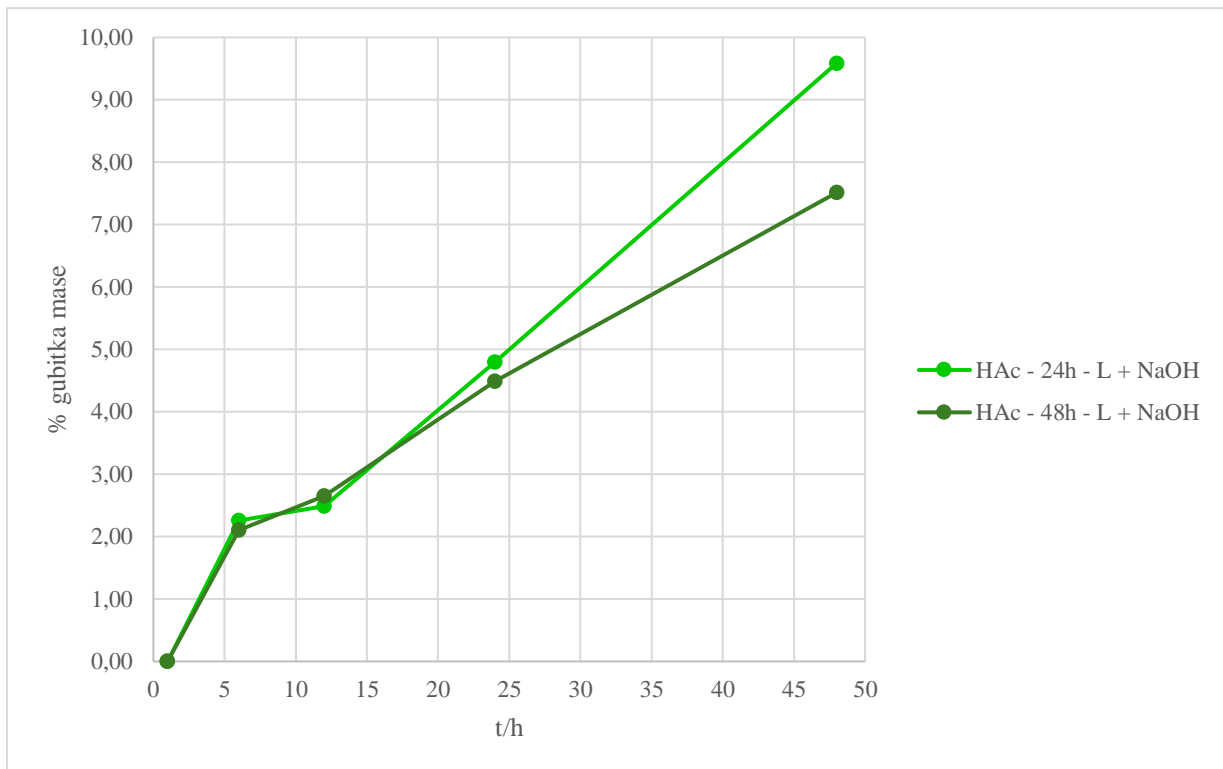
Slika 9. Grafički prikaz gubitka mase u vremenu ispitan na dvije serije uzoraka koje su obrađene liofilizacijom i 1 vol % vodenom otopinom HAc

Kako bi se ispitalo kumulativni učinak na svojstva nosača, uzorci su izloženi kontaktu s kiselinom, a potom kontaktu s lužinom. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da postoji kumulativni učinak koraka obrade na svojstva nosača. Uzorak obrađen kiselinom i lužinom ima znatno veću brzinu razgradnje prije postizanja točke usporavanja reakcije.



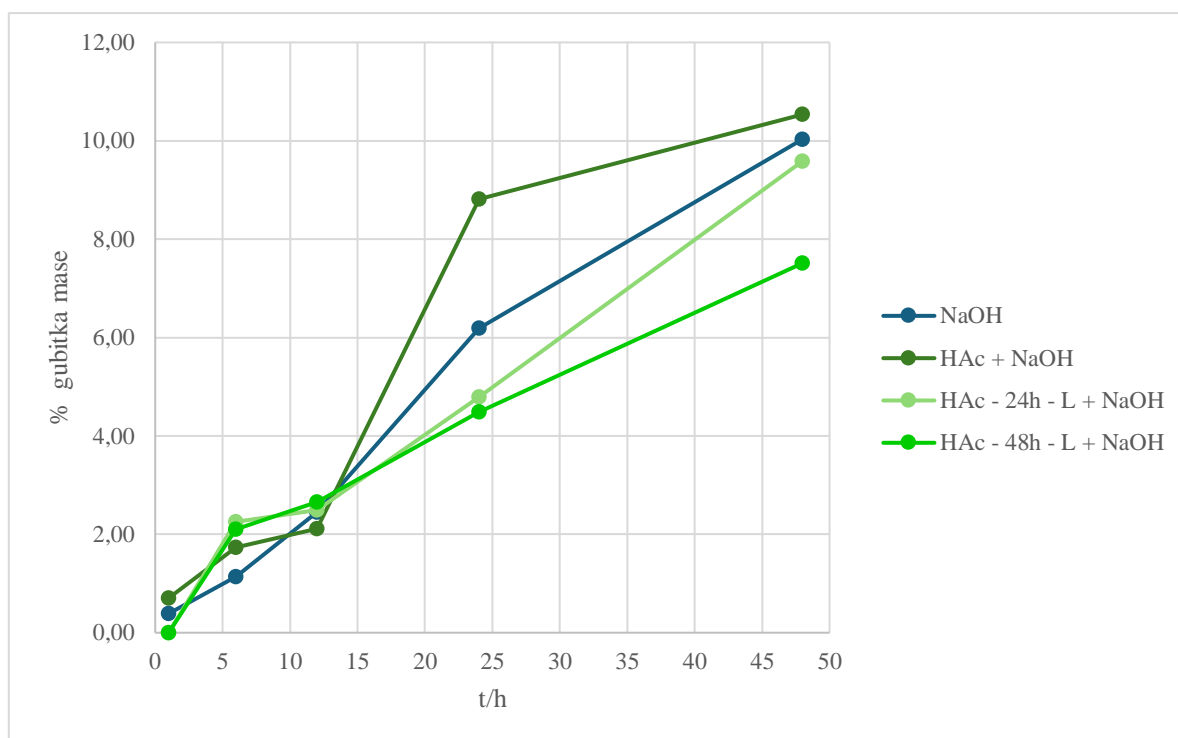
Slika 10. Grafički prikaz rezultata dobivenih postupkom obrade bez liofilizacije za uzorke koji su bili izloženi utjecaju lužine i zajedničkom utjecaju kiseline i lužine

Usporedbom uzoraka izloženih zajedničkom utjecaju kiseline i lužine, obrađenih postupkom liofilizacije nakon kontakta s kiselinom, uočen je jednaki trend gubitka mase. Brzina razgradnje uzorka PLA koji je 48h bio u liofilizatoru sporija je od brzine razgradnje uzorka koji je liofiliziran 24h. Rezultati su prikazani na slici 11.



Slika 11. Prikaz utjecaja obrade uzorka liofilizacijom na ukupni gubitak mase zbog utjecaja lužine

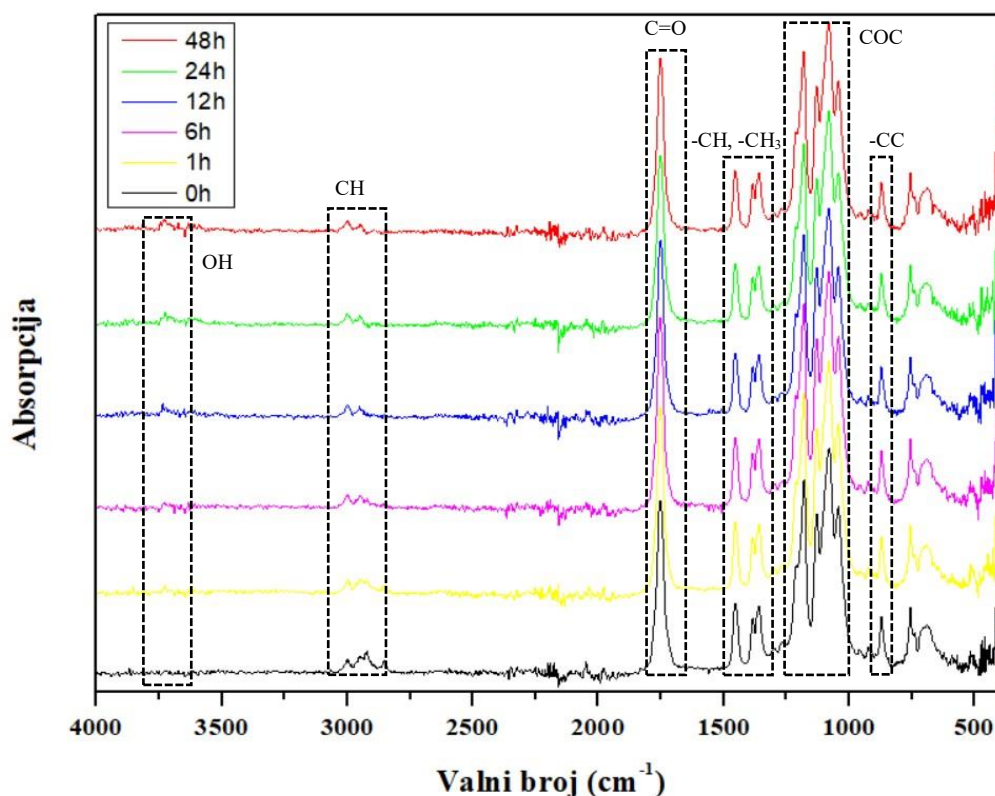
Analizom dobivenih podataka vidljiva je značajna promjena mase uzorka obrađenih otopinom lužine NaOH. Do najznačajnijeg gubitka mase dolazi kod uzorka izloženog otopini kiseline i lužine pri sobnoj temperaturi. Uzorci koji su dulje vrijeme boravili u liofilizatoru na sniženoj temperaturi, u konačnici imaju najmanji gubitak mase.



Slika 12. Prikaz utjecaja koraka obrade kiselinom i liofilizacije na ukupno izgublenu masu zbog kontakta s otopinom NaOH

4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

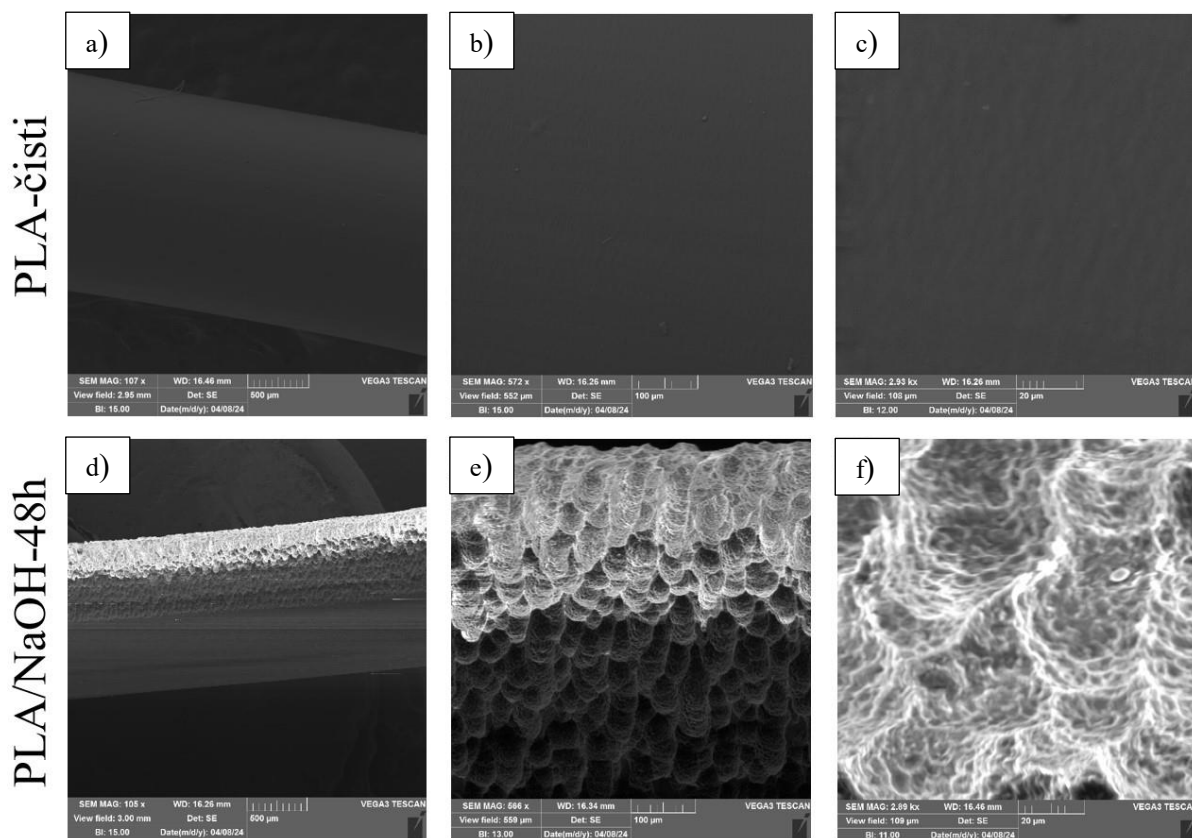
Identifikacija pripremljenih uzoraka, obrađenih otopinom natrijeva hidroksida kod kojih je ujedno i uočena najveća razlika u gubitku mase, infracrvenom spektroskopijom prikazana je na slici 13. Kao referentni uzorak upotrijebljen je čisti PLA koji nije bio izložen utjecajima kiseline i lužine, kao ni utjecaju liofilizacije. Snimljeni infracrveni spektri prikazuju karakteristične vrpce za PLA. Čista PLA sadrži karakterističnu apsorpcijsku vrpcu rastezanja C=O veze esterske skupine s vrpcom pri 1747 cm^{-1} . Asimetrično odnosno simetrično rastezanje C-O-C veze primijećeno je kod 1180 cm^{-1} i 1081 cm^{-1} . CH asimetrično i simetrično rastezanje primijećeno je unutar visokofrekventnog spektra na 2997 i 2946 cm^{-1} . Vrpce na 1456 i 1382 cm^{-1} pripisuju se $-\text{CH}_3$ asimetričnom svijanju i CH simetričnom svijanju. Apсорpcijska vrpca pri 868 cm^{-1} ukazuje na C-C rastezanje. Uzorci u visoko frekventnom području prikazuju promjenu u odnosu na čisti PLA. Pojavljuje se apсорpcijska vrpca karakteristična za rastezanje OH skupine, te su vrpce CH deformacije slabije i nižeg intenziteta. Preostale karakteristične vrpce PLA ostaju postojane tokom svih vremenskih intervala degradacije uzorka [21,22].



Slika 13. FTIR spektri uzoraka PLA koji su bili u kontaktu s otopinom NaOH, bez obrade liofilizacijom

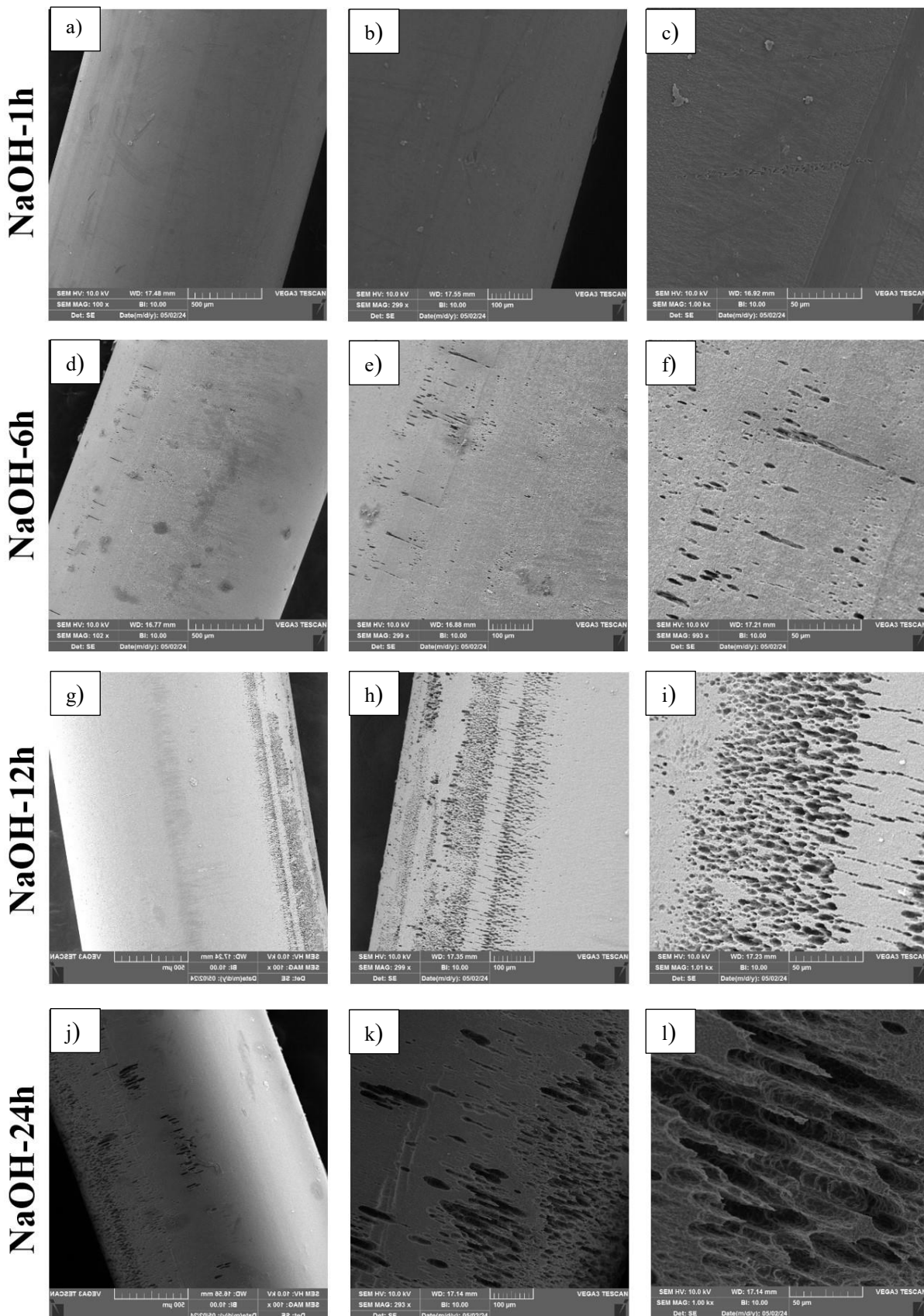
4.3. Pretražna elektronska mikroskopija

Na slici 14 prikazane su mikrografije čiste, netretirane, PLA (a–c) i uzorka PLA koji je bio izložen utjecaju otopine natrijeva hidroksida najdulje vrijeme 48h (d–f), pri različitim povećanjima. Na mikrografijama je vidljiva jasna razlika površine netretiranog i tretiranog PLA. Mikrografije a-c prikazuju glatku površinu PLA filameta, dok je na slikama d-f vidljiva jamičasta, površinska erozija PLA do koje je došlo uslijed katalizirane hidrolize otopinom lužine. Na slici d) također je uočljiv prijelaz između erodirane i glatke površine do čega je došlo zbog sljepljivanja uzorka PLA za dno posude.



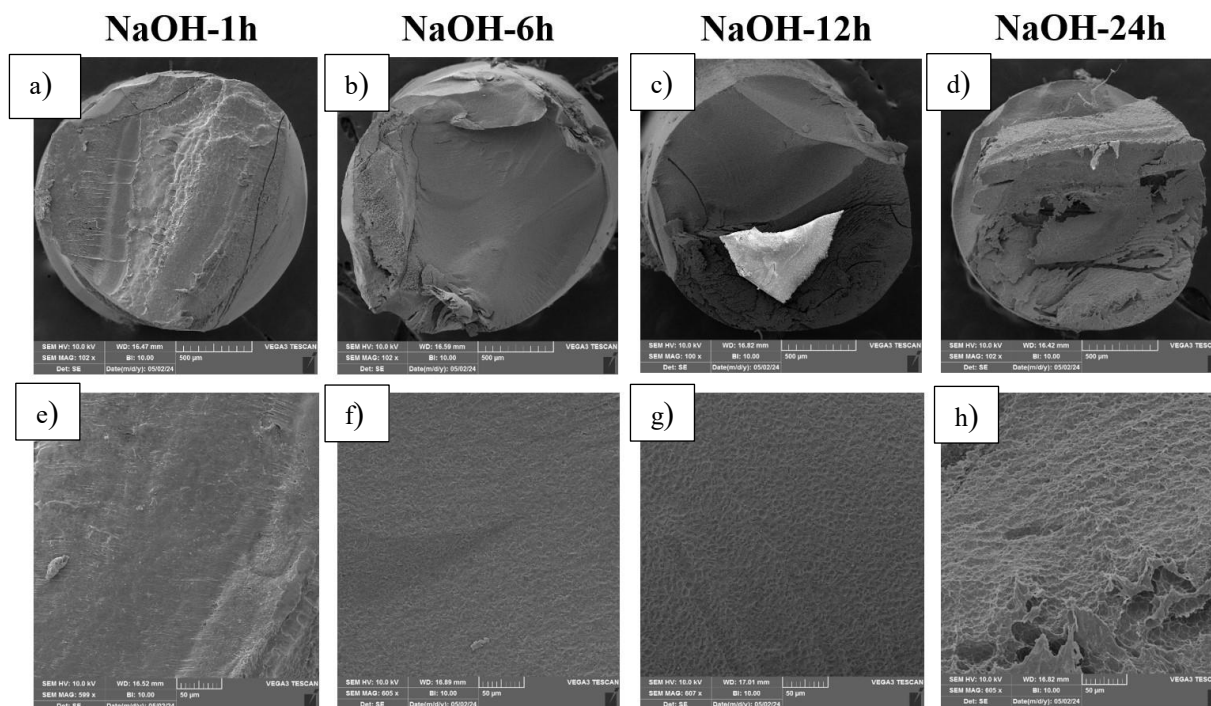
Slika 14. SEM mikrografije uzorka prije provedbe postupka ispitivanja utjecaja lužine (a - c) i uzorka izloženog kontaktu s otopinom natrijeva hidroksida 48 h (d - f)

Na slici 15 prikazani su mikrografije uzoraka izloženih otopini natrijeva hidroksida u vremenskim intervalima od 1h, 6h, 12h i 24h pod uvećanjima od 100x, 300x i 1000x. Vidljiva je mjestimična površinska erozija kod svih uzoraka. Na površini PLA nastaju rupičaste strukture, nalik crticama/kanalčićima. Što je vrijeme degradacije dulje, nastaje više rupičastih struktura koje sve dublje prodiru u masu uzorka.



Slika 15. SEM mikrografije uzoraka izloženih utjecaju otopine natrijeva hidroksida kroz 4 različita vremenska intervala (a - l)

Slika 16. prikazuje presjek PLA filameta izloženih otopini NaOH 1h, 6h, 12 i 24h pri povećanju od 100x i 600x. Nije uočena značajna promjena na presjeku uzorka što ukazuje da se većinska degradacija PLA odvija na površini uzorka. Usporedbom uzorka koji je bio u kontaktu s otopinom natrijeva hidroksida 1h (slika e) i onih koji su s otopinom u kontaktu bili dulje vrijeme (slike f-h) ipak je vidljiva razlika u jamičastoj strukturi. Dobivene mikrografije upućuju da se hidroliza PLA jednim dijelom odvija i u masi uzorka.



Slika 16. SEM mikrografije presjeka uzorka izloženih utjecaju otopine natrijeva hidroksida u 4 različita vremenska intervala (a - h)

5. ZAKLJUČAK

Analizom dobivenih rezultata, potvrđena je hipoteza da do gubitka mase pri pripremi kompozita dolazi zbog kontakta PLA s vodenom otopinom lužine. Bazni uvjeti u mediju kataliziraju proces razgradnje. Samostalni utjecaj otopine kiseline na svojstva nosača PLA nije ustanovljen, kao ni utjecaj postupka liofilizacije. Sinergijski utjecaj koraka sinteze postoji – prethodna obrada otopinom octene kiseline pospješuje reakciju razgradnje PLA kataliziranu otopinom natrijevim hidroksidom.

SEM analizom potvrđena je površinska erozija uzorka nakon izlaganja PLA uzoraka otopini natrijeve lužine, no uočena je i hidroliza unutar mase. FTIR spektroskopijom potvrđena je prisutnost -OH skupine kod svih uzoraka izloženih otopini natrijeva hidroksida, što je izravni indikator procesa hidrolize.

Za daljnji razvoj PLA/CHT-HAp kompozita potrebne su dodatne analize, u kraćim vremenskim intervalima kako bi se što bolje simulirali uvjeti pripreve nosača.

6. LITERATURA

1. Hui, E. Pasquier, A. Solberg, K. Agrenius, J. Håkansson, G. Chinga-Carrasco, Biocomposites containing poly(lactic acid) and chitosan for 3D printing – Assessment of mechanical, antibacterial and in vitro biodegradability properties, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **147** (2023) 106 – 136
2. Rogina, L. Pribolšan, A. Hanžek, L. Gómez-Estrada, G. Gallego Ferrer, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Macroporous poly(lactic acid) construct supporting the osteoinductive porous chitosan-based hydrogel for bone tissue engineering, *Polymer*, **98** (2016) 172 – 181
3. Ressler, A. Chitosan-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering Applications: A Short Review, *Polymers*, **14** (2022) 3430
4. Byers J. A., Biernesser A. B., Delle Chiaie K. R., Kaur A., Kehl J. A., Catalytic Systems for the Production of Poly (lactic acid) u: M. L. Di Lorenzo, R. Androsch, Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid, Springer International Publishing, 2018, 67–118
5. 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) 3
6. Balla E, Daniilidis V, Karlioti G, Kalamas T, Stefanidou M, Bikiaris ND, Vlachopoulos A, Koumentakou I, Bikiaris DN. Poly(lactic Acid): A Versatile Biobased Polymer for the Future with Multifunctional Properties—From Monomer Synthesis, Polymerization Techniques and Molecular Weight Increase to PLA Applications. *Polymers*. 2021; 13(11):1822
7. Qiu, T.Y., Song, M. & Zhao, L.G. Testing, characterization and modelling of mechanical behaviour of poly (lactic-acid) and poly (butylene succinate) blends. *Mech Adv Mater Mod Process* **2**, 7 (2016)
8. Sreekumar K., Bindhu B., Veluraja K., Perspectives of polylactic acid from structure to applications, *Polymers from Renewable Resources*, **12** (2021) 60 – 74
9. Singhvi M.S., Zinjarde S.S., Gokhale D.V., Polylactic acid: synthesis and biomedical applications, *Journal of Applied Microbiology*, **127** (2019) 1612 – 1626

-
10. Kim, S. H., & Kim, Y. H., Direct condensation polymerization of lactic acid, u: *Macromolecular Symposia*, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (1999) 277-287
 11. Saeidlou S., Huneault M. A., Li H., Park C. B., Poly(lactic acid) crystallization, *Progress in Polymer Science*, **37** (12) (2012) 1657-1677
 12. Singhvi M., Jadhav A., Gokhale D., Supplementation of medium with diammonium hydrogen phosphate enhanced the d-lactate dehydrogenase levels leading to increased d-lactic acid productivity, *Bioresource Technology*, **146** (2013) 736-739
 13. Suroto N.S., Al Fauzi A., Widiyanti P., Bella F. R, Biocompatibility evaluation of electrospun Poly-L lactic Acid-chitosan immobilized with heparin as scaffold for vascular tissue repair, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, **8**(3) (2023), 2468-2179
 14. Gorrasi G., Pantani R., Hydrolysis and Biodegradation of Poly(lactic acid) u: Di Lorenzo M. L., Androsch R., Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid, Springer International Publishing, 2018, 119-151
 15. Cam D., Hyon S.H., Ikada Y., Degradation of high molecular weight poly-(L-lactide) in alkaline medium, *Biomaterials*, **16** (1995) 833–843
 16. L. Xu, Crawford K., Gorman C. B., Effect of Temperature and pH on the Degradation of Poly(lactic acid) Brushes, *Macromolecules* 2011, **44**, 12, 4777–4782
 17. Velghe, I.; Buffel, B.; Vandeginste, V.; Thielemans, W.; Desplentere, F. Review on the Degradation of Poly(lactic acid) during Melt Processing. *Polymers* **2023**, *15*, 2047
 18. Elsayy M. A., Kim K., Park J.-W., Deep A., Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **79** (2017) 1346-1352
 19. P. Pawar, R., U. Tekale, S., U. Shisodia, S., T. Totre, J., & J. Domb, A., Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid), *Recent Patents on Regenerative Medicine*, **4** (2014) 40 – 51
 20. Guarino, V., Causa, F., Taddei, P., Di Foggia, M., Ciapetti, G., Martini, D. & Ambrosio, L., Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **29**(27) (2008) 3662-3670
 21. Mucha M., Bialas S., and Kaczmarek H., Effect of nanosilver on the photodegradation of poly(lactic acid), *J. Appl. Polym. Sci*, **131** (2014), 40144

-
22. 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