



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I  
TEHNOLOGIJE**



**Roko Blažic, Antonia Ressler, Denis Žagar**

***In vitro* enzimsko razgradnja poli( $\epsilon$ -kapolaktona) i PCL/GEL  
mješavine za biomedicinsku primjenu**

**Zagreb, 2015.**

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za inženjerstvo površina polimernih materijala, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Mirele Leskovic, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014/2015.*

## Popis kratica i simbola

<b>T</b>	temperatura ( °C )
<b>w</b>	maseni udio ( % )
<b>p</b>	tlak (Pa)
<b>t</b>	vrijeme (s)
<b>ε</b>	prekidno istezanje ( % )
<b>σ</b>	prekidna čvrstoća (MPa)
<b>E</b>	rastezni modul (MPa)
<b>T<sub>g</sub></b>	staklište (°C)
<b>T<sub>m</sub></b>	talište (°C)
<b>T<sub>c</sub></b>	kristalište (°C)
<b>T<sub>on set</sub></b>	temperatura početka razgradnje (°C)
<b>T<sub>max</sub></b>	temperatura kraja razgradnje (°C)
<b>T<sub>end</sub></b>	temperatura maksimalne brzine razgradnje (°C)
<b>ΔH<sub>m</sub></b>	entalpija taljenja (J/g)
<b>ΔH<sub>c</sub></b>	entalpija kristalizacije (J/g)
<b>PD</b>	polidisperznost
<b>X<sub>c</sub></b>	stupanj kristalnosti ( % )
<b>Δm</b>	gubitak mase ( % )
<b>λ</b>	valna duljina (cm <sup>-1</sup> )
<b>γ<sup>d</sup></b>	disperzijska komponenta slobodne površinske energije (mJm <sup>-2</sup> )
<b>γ<sup>p</sup></b>	polarna komponenta slobodne površinske energije (mJm <sup>-2</sup> )
<b>γ</b>	ukupna slobodna površinska energija (mJm <sup>-2</sup> )
<b>γ<sup>sl</sup></b>	slobodna energija međupovršine (mJm <sup>-2</sup> )
<b>θ</b>	kontaktni kut (°)
<b>S</b>	koeficijent razlijevanja (mJm <sup>-2</sup> )
<b>W<sub>a</sub></b>	rad adhezije (mJm <sup>-2</sup> )
<b>M</b>	molekulska masa (g/mol)
<b>M<sub>n</sub></b>	brojčani prosjek molekulskih masa
<b>M<sub>w</sub></b>	maseni prosjek molekulskih masa
<b>Ve</b>	volumen eluiranja
<b>TGA</b>	termogravimetrijska analiza
<b>DSC</b>	diferencijalna pretražna kalorimetrija
<b>SEM</b>	pretražni elektronski mikroskop
<b>GPC (SEC)</b>	kromatografija isključenja po veličini ( <i>engl. Size exclusion chromatography</i> )
<b>FTIR</b>	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

<b>ATR</b>	Infracrvena spektroskopija: Prigušena totalna refleksija ( <i>engl. Infrared spectroscopy: Attenuated total reflection</i> )
<b>Ser</b>	serin
<b>His</b>	histidin
<b>Asp</b>	asparaginska kiselina
<b>Glu</b>	glutamiska kiselina
<b>PCL</b>	poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
<b>PCL/GEL</b>	mješaina poli( $\epsilon$ -kaprolakton) i želatine
<b>CT</b>	kutinaza
<b>AM</b>	amilaza
<b>PBS</b>	fosfatom puferirana otopina soli ( <i>engl. Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PBS/CT</b>	medij fosfatnog pufera i kutinaze
<b>PBS/AM</b>	medij fosfatnog pufera i amilaze

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	1
2.1. Inženjerstvo tkiva .....	1
2.1.1. Građa tvrdog koštanog tkiva .....	1
2.1.2. Materijali za biomedicinsku primjenu.....	3
2.2. Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL).....	5
2.2.1. Sinteza PCL-a.....	5
2.2.2. Primjena PCL-a u medicini .....	6
2.2.3. Biorazgradivost PCL-a .....	6
2.3. Enzimi [18].....	7
2.3.1. Kutinaza.....	8
2.3.2. $\alpha$ -amilaza .....	9
2.4. Želatina.....	10
2.5. Površinske metode karakterizacije .....	11
2.5.1. FTIR-ATR spektroskopija.....	11
2.5.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM).....	11
2.5.3. Mjerenje kontaktnog kuta.....	12
2.6. Toplinske metode karakterizacije.....	12
2.6.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) .....	12
2.6.2. Termogravimetrijska analiza (TGA) .....	13
2.7. Mehanička svojstva materijala .....	13
2.8. Određivanje raspodjele molekulskih masa .....	14
2.8. 1. Kromatografija isključenja po veličini (SEC) .....	14
4. MATERIJALI I METODE .....	17
4.1. Materijali .....	17
4.2. Priprava PCL/GEL mješavina .....	18
4.3. Priprava fosfatom puferirane otopine soli (PBS) .....	19
4.4. Postupak hidrolitičke razgradnje .....	19
4.5. Mjerenje kontaktnog kuta.....	20
4.6. Infracrvena spektroskopija (FTIR-ATR).....	20
4.7. Određivanje raspodjele molekulskih masa .....	21
4.8. Diferencijalna pretražna kalorimetrija.....	21
4.9. Termogravimetrijska analiza .....	22
4.10. Određivanje mehaničkih svojstava.....	23
4.11. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM).....	23
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	25

5.1. Utjecaj enzimske razgradnje na promjenu mase .....	25
5.1.1. Promjena mase tijekom 7 dana.....	25
5.1.2. Promjena mase tijekom 4 tjedna.....	27
5.1.3 Kromatografija isključenjem po veličini (SEC).....	32
5. 2. Karakterizacija površine.....	34
5.2.1. Rezultati FTIR-ATR spektroskopije .....	34
5.2.2. Slobodna površinska energija i parametri adhezije PCL/GEL mješavine.....	38
5.2.3 Mjerenja kontaktnog kuta različitim testnim kapljevina.....	39
5.2.4 Kontaktni kut s vodom (hidrofilnost).....	40
5.3. Toplinska svojstva PCL i PCL/GEL mješavina .....	43
5.3.1. Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije - (DSC).....	43
5.3.2 Rezultati termogravimetrijske analize .....	48
5.4. Rezultati mehaničkih svojstava .....	53
5.5 Morfološka struktura .....	61
5.5.1 Elektronska pretražna mikroskopija, SEM.....	61
6. ZAKLJUČCI .....	70
7. ZAHVALA.....	72
8.LITERATURA.....	73
9. SAŽETAK.....	77
10. SUMMARY .....	78



## 1. UVOD

Razgradnja implantiranih materijala u ortopedskom inženjerstvu tkiva izuzetno je važna jer otklanja potrebu za uklanjanjem implantata u drugom kirurškom zahvatu, te osigurava prostor za rast prirodnog tkiva. Stoga je navedenu razgradnju potrebno postići brzinom koja omogućuje regeneraciju prirodnog tkiva na mjestu oštećenja. U međuvremenu, djelomično razgrađeni nosači (*scaffold*) moraju održavati njihovu mehaničku cjelovitost, dok novoformirano tkivo ne preuzme funkcije i potpuno ih zamijeni.

Razgradnju materijala pokreće nekoliko mehanizama, uključujući hidrolizu i enzimsku razgradnju. Većina sintetskih polimera razgrađuje se hidrolizom njihovih esterskih veza. Ova razgradnja općenito nastaje mehanizmima površinske erozije sloja, ovisno o vodopropusnosti nosača. S druge pak strane, mnogi prirodni materijali i neki polimeri, uključujući razgradive peptidne nizove, razgrađuju se enzimskim mehanizmima.<sup>1-3</sup>

Najistaknutija skupina biorazgradivih materijala su alifatski poliesteri, jer su se pokazali korisnima za niz biomedicinskih primjena. Alifatski se poliesteri razgrađuju jednim ili kombinacijom više mehanizama npr. hidrolizom, enzimatskom, mikrobnom i toplinskom razgradnjom.

Razgradnja *in vitro* polukristalastih poliestera odvija se u dva koraka. Prvi korak uključuje upijanje vode i posljedičnu razgradnju amorfnih, manje organiziranih područja. U drugom koraku, kad su gotovo svi amorfni dijelovi razgrađeni, započinje hidroliza u kristalastim područjima polazeći od ruba i nastavljajući prema sredini. Hidrolitička razgradnja je katalizirana karboksilnim krajnjim skupinama stvorenim cijepanjem lanaca. Dakle, hidroliza alifatskih poliestera je autokatalizirana gdje nastaju razgradni produkti koji dalje kataliziraju hidrolizu. Proizvodi razgradnje se pojavljuju u velikom omjeru i na površini. Međutim, samo se produkti nastali na površini otapaju u okolnom mediju. U unutarnjem se dijelu akumuliraju krajnje karboksilne skupine, pa je razgradnja brža unutar materijala.

Prema tome, veliki uzorci pokazuju nehomogenu razgradnju. Iako se molekularna masa smanjuje tijekom procesa razgradnje, gubitak mase se ne opaža sve dok molekularna masa ne padne ispod određene razine, gdje oligomeri mogu difundirati iz strukture. Kad krene, gubitak mase se brzo povećava dok ne ostane samo vanjska ljuska.

U ovom radu istražen je utjecaj proteinske komponente želatine na brzinu enzimske razgradnje poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) kako bi se dobio materijal zadovoljavajućih svojstava, definirane brzine razgradnje koji bi mogao naći primjenu za izradu elemenata za fikasaciju koštanog tkiva. Provedena su istraživanja svojstava i brzine razgradnje PCL polimera i PCL/GEL mješavine u puferiranoj otopini fosfata (PBS) uz enzime kutinazu i  $\alpha$ -amilazu tijekom 4 tjedna inkubacije pri 37°C.



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Inženjerstvo tkiva

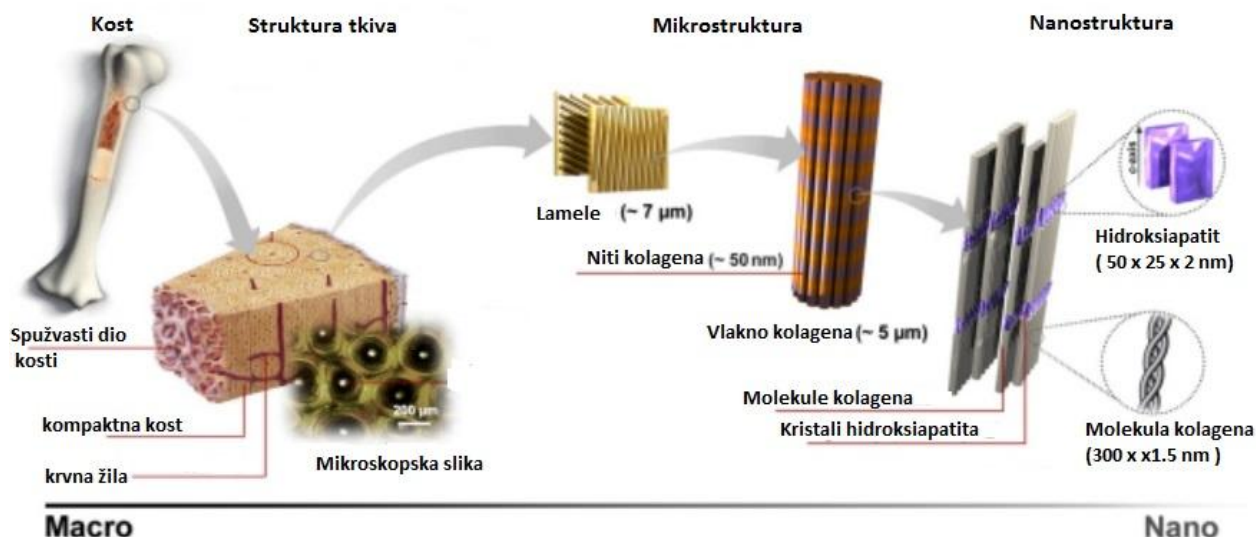
Koštani defekti predstavljaju veliki problem u ortopediji i stomatologiji. Oštećenja kostiju mogu biti posljedica raznih prijeloma, koštano-mišićnih bolesti, reumatskog artritisa te predstavljaju veliki problem u medicini. Istraživanja su pokazala da se kosti mogu brže obnoviti uporabom prirodnih ili sintetskih koštanih implantata. Ti implantati (presadci) trebali bi poticati obnovu kosti, to jest stvaranje novih koštanih stanica [1]. Inženjerstvo tkiva (engl. *tissue engineering*, TE) predstavlja potencijalnu alternativu koja će zamijeniti konvencionalne metode, jer umanjuje mogućnost prijenosa bolesti, a proizvodnja je moguća u neograničenim količinama [2].

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno polje koje uključuju znanja biologije, kemije, fizike, medicine i inženjerstva koji će u budućnosti na revolucionaran način poboljšati zdravlje i kvalitetu života razvitkom tkiva, koja će imati mogućnost obnoviti, održavati, poboljšati ili zamijeniti prirodno tkivo kod kojeg je došlo do zatajenja ili gubitka dijela tkiva. [3]. Inženjerstvo tkiva zahtijeva biokompatibilni materijal koji se može koristiti kao okosnica za stanice i za rast novog tkiva. Nedostaci dosadašnjih načina uzgoja kosti (uzimanje uzorka kosti koje je popraćeno jakim bolovima) potaknuli su istraživanja drugih alternativa za stvaranje nove kosti, pomoću spomenutog koncepta inženjerstva tkiva, pri čemu se stanice kombiniraju sa poroznom okosnicom. Pomoću metoda *in vivo* i *in vitro* može se na kontroliran način, bez potrebe stanica donora (transplantacije) i čimbenika rasta, dobiti umjetna kost [4,5]. Inženjerstvo tkiva koristi okosnicu za poticanje rasta (obnovu) kosti pomoću okolnog tkiva (*in vivo*), ili okosnicu koja je „predložak za isporuku“ ugrađenih koštanih stanica i tkiva dobivenih *in vitro*.

Okosnica bi trebala oponašati strukturu i biološku funkciju zamijenjenog tkiva, te imati kemijska i fizička (mehanička) svojstva kao prirodno tkivo koje se zamjenjuje [4]. Idealan materijal ne samo što mora zadovoljavati mehaničku stabilnost zbog stanica koje će nastati i rasti, već mora imati i zadovoljavajuću mehaničku stabilnost zbog okolnog tkiva (prije nastajanja novog funkcionalnog tkiva) [6].

#### 2.1.1. Građa tvrdog koštanog tkiva

Kosti svih kralježnjaka su prirodni kompozitni materijal, gdje je jedna od komponenta anorganska tvar. Anorganska tvar koja se nalazi u kostima i zubima je karbonatni hidroksiapatit (CHA) koji zauzima 65 % ukupne koštane mase, a ostatak mase su organske tvari i voda. Veći dio organske tvari je kolagen čije se molekule spajaju tako da formiraju linearne lance u niz vlakana, makroskopske strukture. Između lanaca kolagena nalaze se nanokristali apatita. Na slici 1. je prikazana struktura kosti pri različitim uvećanjima, od makrometarske do nanometarske skale [5].



**Slika 1.** Struktura (morfologija) kosti pri različitim uvećanjima. [7]

Zbog prirode sinteze organskog dijela kosti postoji više čimbenika koji utječu na samu čvrstoću kosti kao što su dob, rod, položaj u tijelu, temperatura, mineralni sadržaj, prisutna količina vode, bolest (npr. osteoporozna). Spomenuti čimbenici su ovisni jedan o drugome na primjer sadržaj minerala će se mijenjati ovisno o položaju kosti u tijelu, te o dobi pacijenta. Osteoporozna je bolest koja uključuje značajno smanjenje koštane mase, a najčešće se javlja kod žene u postmenopauzi. U tablici 1. su prikazani podatci dobiveni mjerenjem mehaničkih svojstava prirodne kosti, te se treba uzeti u obzir da su dobiveni podaci ovisni o temperaturi.

**Tablica 1.** Mehanička svojstva prirodne kosti i njenih sastavnih komponentata

MATERIJAL	MODUL, E / GPa
KOLAGEN (suh)	6
HIDROKSIAPATIT	80
KORTIKALNA KOST (LONGITUDINALNO)	11-21
KORTIKALNA KOST (TRANSVERZALNO)	5-13

Kosti kralježnjaka možemo nazvati „živućim biopolimerima“ zbog toga što su stanice unutar kosti pod stalnom aktivnošću. Materijali za inženjerstvo koštanog tkiva moraju imati dobra mehanička svojstva i mogućnost lakog preoblikovanja i prerade zbog stvaranja poroznih struktura kroz koje se mogu odvijati biološki procesi kao u prirodnoj kosti [8,9].

## 2.1.2. Materijali za biomedicinsku primjenu

Materijali koji se najčešće koriste kao implantati su napravljeni od metala zbog izrazito dobrih mehaničkih svojstava. Međutim, postoje problemi koji se javljaju kod ove vrste implantata kao što je potreba za preglednom operacijom, refrakture nakon uklanjanja implantata, trošenje, visoka toplinska i električna vodljivost, loše vezivanje tkiva, ili odbacivanje tkiva.

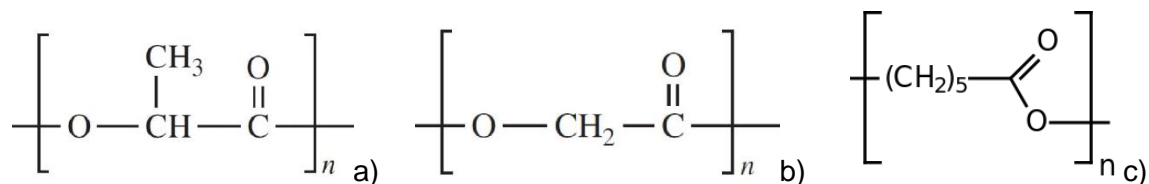
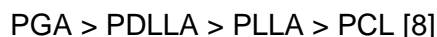
U zadnjih 20-30 godina istraživanja su usmjerena na razvoj biorazgradivih koštanih implantata jer omogućuju ponovni rast i obnovu koštanog tkiva. Bitno je da je brzina razgradnje implantata jednaka brzini nastajanja novog koštanog tkiva. Opći uvjet za odabir polimera kao biomaterijala je da njegova mehanička svojstva i vrijeme razgradnje odgovaraju potrebama primjene. Mehanička svojstva moraju odgovarati primjeni i moraju zadržati ta svojstva sve dok novo koštano tkivo u potpunosti ne zaraste [6]. Idealni polimer za primjenu kao biopolimer treba imati sljedeće karakteristike:

- Protuupalno, netoksično, biokompatibilno, antikancerogeno djelovanje
- Mogućnost metaboličkog uklanjanja bez ostavljanja tragova
- Pehvatljiv "rok trajanja"
- Lako steriliziranje
- Lako oblikovanje u željeni oblik [10]

Prirodni polimeri su primjenjivi u uskom području, jer su skupi, skloni su varijacijama svojstava istih uzoraka, te su skloni zagađivanju s nepoznatim virusima i bakterijama. Naprotiv, sintetičkim polimernim biomaterijalima lako se kontroliraju fizikalno-kemijska svojstva i kvaliteta. Također se mogu pripremiti s različitim tehnikama i dosljedno proizvoditi u velikim količinama. Molekularna struktura i molekulska masa lako se podešavaju u postupcima sinteze u cilju prilagodbe fizičkih i mehaničkih svojstava okosnice za inženjerstvo tkiva ovisno u koje mjesto u tijelu se ugrađuje. Sintetički polimeri se mogu podijeliti u dvije kategorije: biorazgradivi i ne-biorazgradivi. Od navedene dvije vrste sintetskih polimera, sintetski biorazgradivi polimeri su poželjniji za primjenu u inženjerstvu tkiva jer smanjuju moguću reakciju tijela na novo strano tijelo i vode do stvaranja potpuno novog prirodnog tkiva (stvarajući okosnice za mehaničku i biološku podršku tijekom rasta novog tkiva). Sintetički biomaterijali su biološki inertni, imaju predvidljiva i ujednačena svojstva. Hidrolitički razgradivi polimeri su poželjniji od onih koji se razgrađuju enzimskim mehanizmom iz razloga što je manja varijacija u mehanizmima od pacijenta do pacijenta [10,11].

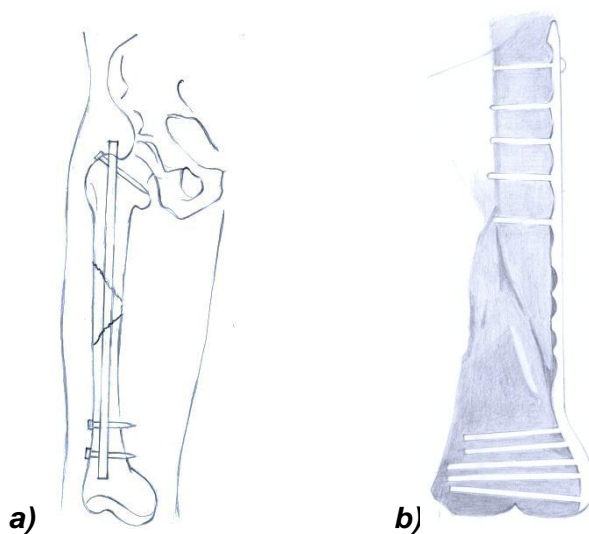
Vrlo malo polimera ima tako dobra mehanička svojstva kao metal, pa je izbor materijala za primjenu u biomedicini ograničen. Neki od njih koji zadovoljavaju mehanička i kemijska svojstva su: poli( $\alpha$ -2-hidroksi etanske kiseline), poli( $\alpha$ -hidroksi kiseline), poli( $\beta$ -hidroksi kiseline)

(polialkanoati), poliuretani, poliortoesteri, polikarbonati ili kopolimeri navedenih polimera. Sljedeć razgradnje poliesteru smanjuje se sljedećim redom:

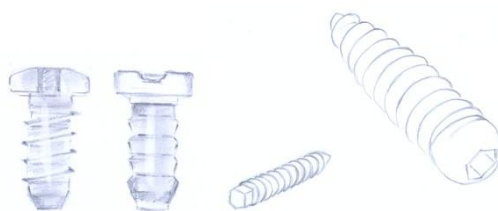


**Slika 2.** Struktura a) PLA(polilaktid), b) PGA (poliglikolid) i c) PCL (poli(ε-kaprolakton))

Na slici 2. su prikazane strukture glavna tri predstavnika poli(α-hidroksi kiselina). Za primjenu u biomedicini najviše se koriste poli(α-hidroksi kiselina), a glavna tri predstavnika su PLA (polilaktid), PGA (poliglikolid) i PCL (poli(ε-kaprolakton)), ali se u zadnje vrijeme najviše istražuje PCL. Koriste se za fiksaciju kostiju nakon loma (npr. vijci, pločice i čavlići), slika 3., izradu dentalnih implantata, slika 4., prekrivanje rana (npr. umjetna koža), zatvaranje rane (šavovima i kirurške spojnice). [12]



**Slika 3.** Skica fiksacije bedrene kosti nakon loma a) intramedularnim čavlicima i b) rendgenske snimke loma bedrene kosti učvršćene pločicom i vijcima



**Slika 4.** Skica različitih implantata: vijaka i čavličića, dentalnog implantata i rekonstrukcijskog vijaka



**Slika 5.** Skica pločice za fiksaciju

## 2.2. Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL)

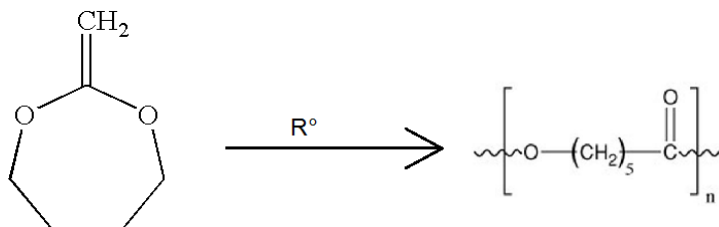
### 2.2.1. Sinteza PCL-a

Molekularna struktura PCL-a sastoji se od pet nepolarnih metilenskih skupina ( $-\text{CH}_2-$ ) i jedne esterske skupine (esterska skupina je relativno polarna) povezanih u lanac. Polimerizacija otvaranjem prstena (ROP) (engl. *ring-opening polymerization*) je jedan od načina dobivanja poli( $\epsilon$ -kaprolaktona), slika 6. To je polimerizacija u kojoj otvaranje prstena monomera rezultira monomernom jedinicom koja ili nije prstenaste strukture ili sadrži manje prstenova nego ciklički monomer. PCL se može dobiti tako da se prsten  $\epsilon$ -kaprolaktona otvori koristeći anionske, kationske ili koordinacijske katalizatore. Nakon otvaranja prstena  $\epsilon$ -kaprolaktona slijedi polimerizacija. [10,13,14]



**Slika 6.** Sinteza poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) polimerizacijom otvaranja prstena (engl. *ring-opening polymerization*, ROP) [13]

Drugi način je otvaranje prstena, 2-metilen-1,3-dioksipana (etilen keten acetal), radikalskom polimerizacijom, slika 7. Radikalska polimerizacija je lančana polimerizacija u kojoj su radikali aktivni centri ( $\text{R}^\circ$ ).



**Slika 7.** Sinteza poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) metodom radikalske polimerizacije 2-metilen-1,3-dioksociklopentana [13]

## 2.2.2. Primjena PCL-a u biomedicini

Poli( $\epsilon$ -kapolakton) (PCL) sintetski je polimer koji se istražuje za potencijalnu primjeru u biomedicini. Kristaliničan je polimer sporog stupnja razgradnje što daje dovoljni vremenski period za stvaranje novog koštanog tkiva ukoliko se koristi kao koštani implantat. Najveći broj istraživanja PCL-a bazira se na isporuci lijekova, za koštane implantate i injektabilne koštane zamjene. Prednost u korištenju PCL-a u inženjerstvu tkiva je biostabilnost i mehanička svojstva koja osiguravaju dugoročnu prisutnost i elastičnost. PCL izaziva blagi upalni proces, a adhezija i rast stanica je ograničena zbog njegove hidrofobnosti. Kombinacijom sa drugim polimerima moguće je smanjenje hidrofobnosti, npr. sa poli (etilen glikolom) (PEG) [15]. Temperatura taljenja PCL-a ( $T_m$ ) u rasponu je između 59 - 64 °C, a ovisi o stupnju kristalnosti. Temperatura staklastog prijelaza ( $T_g$ ) nalazi se ispod sobne temperature, na -60 °C. PCL također pokazuje relativno visoku toplinsku stabilnost s temperaturom degradacije ( $T_d$ ) 350°C, dok su drugi poliesteri razgradivi na nižim temperaturama (235 - 255°C). PCL je komercijalno dostupan u različitim molekularnim težinama od 3 000 do 80 000 g/mol. Što je veća molekularna masa to su i mehanička svojstva materijala bolja, tako da PCL pri visokim molekularnim masama pokazuje odlična mehanička svojstva, ali sporiju razgradnju [16].

Vrlo vrijedno svojstvo PCL je njegova sposobnost da formira spoj s nizom drugih polimera (drugi poliesteri, polietilen, polipropilen, poli (metil metakrilat), poli (vinil acetat), chitosan, itd.) koji proširuje niz svojstava samog PCL-a. PCL je topljiv na sobnoj temperaturi u kloroformu, diklorometanu, octenoj kiselini, tetrahidrofuranu i toluenu, nisku topljivost ima u acetonu, 2-butanonu, etil-acetatu, a netopiv je u alkoholu, petroleju i dietil- eteru.

Brzina razgradnje homopolimera PCL vrlo je ovisna o nekoliko čimbenika, uključujući stupanj kristalnosti, molekularnu masu, morfologiju i uvjetima u kojima se nalazi, kao što su pH i T. Poznato je da se PCL može degradirati u prisutnosti enzima, posebno enzima lipaze, bakterijskih i gljivičnih sojeva [17]. Također pronađeno je da se mogu PCL razgraditi hidrolitičkim mehanizma pri fiziološkim uvjetima. Hidrolitička nestabilnost je prisutna zbog osjetljivosti alifatskih esterskih veza na hidrolizu, koji je svojstvena karakteristika PCL i njegovih kopolimera. Amorfni dijelovi polu-kristalnog polimera razgrađuju se prije od kristalnih područja. PCL obično ima najviši stupanj kristalnosti i najsporiju brzinu degradacije u usporedbi sa najčešće biorazgradivim polimerima kao što PLA i PLGA. Budući da PCL degradira polako kombinira se sa drugim biorazgradivim polimerima, koji utječu na degradaciju PCL-a [8].

## 2.2.3. Biorazgradivost PCL-a

Biorazgradivost se bazira na polakom razaranju materijala na manje, netoksične molekule koje su topljive u vodi kako bi se kroz bubrege mogle izbaciti iz organizma. Poput ostalih poliestera, PCL autokatalizira hidrolizu (degradaciju) zbog osjetljivosti njegove alifatske

esterske veze. Međutim, hidrofobni, polu-kristalni polimer usporava razgradnju u odnosu na druge alifatske poliestere kao PLGA, što je prikladnije za primjenu kada je to svojstvo povoljno. Hidrolizom se cijepa esterska veza te nastaju oligomerne molekule. Degradacija PCL-a odvija se u dva stupnja. Prvi je nasumična hidroliza esterskih veza, a drugi gubitak mase zbog difuzije oligomernih jedinica iz mase materijala. Ovisno o molekulskoj masi PCL-a, degradacija može trajati i godinama *in vivo*. Mehanizam degradacije rezultat je više faktora, uključujući:

- kemijska stabilnost polimera
- kristalnost
- aditivi i nečistoće
- geometrija uzorka
- medij u kojem se polimer nalazi [10]

### **2.3. Enzimi [18]**

Enzimi su biokatalizatori čije djelovanje omogućuje odvijanje kemijskih procesa u organizmu. Enzimi, kao i drugi katalizatori snižavaju energiju aktivacije, ali za razliku od kemijskih katalizatora enzimi djeluju vrlo specifično. Specifičnost djelovanja enzima je posljedica svojstava katalitički aktivnog centra. Prilikom enzimske katalize uvijek je katalizirana samo jedna reakcija, to jest ne dolazi do pojave sporednih reakcija. Osim toga, enzimi pokazuju selektivnost prema vezanju određenih molekula što je posljedica veličine enzima, steričke konformacije i raspodjele naboja u katalitičkom središtu enzima. Enzimi su i stereospecifični jer kataliziraju reakcije samo jednog od enantiomera. Enzimi su najčešće globularni proteini te se njihov polipeptidni lanac sastoji od niza povezanih L- $\alpha$ -aminokiselina. Osim proteinskog dijela, enzimi mogu sadržavati i razne neproteinske molekule ili ione metala koji izravno sudjeluju u vezanju supstrata ili u katalizi (prostetičke skupine, kofaktori, koenzimi).

Redoslijed aminokiselina čini primarnu strukturu polipeptidnog lanca enzima. Uspostavljanjem intramolekularnih ili intermolekularnih vodikovih veza između karbonilne skupine i protona –NH skupine druge peptidne veze izgrađuje se sekundarna struktura polipeptidnog lanca. Polipeptidni lanac zauzima određeni prostorni oblik, to jest lanac je na određeni način nabran. Vrsta nabiranja utvrđena je redoslijedom aminokiselina. Dvije vrlo raširene nabrane strukture su  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča. U  $\alpha$ -uzvojnici uspostavljaju se intramolekularne vodikove veze između karbonilne skupine i protona –NH skupine druge peptidne veze te peptidni lanac poprima oblik spirale (uzvojnice). Kod  $\beta$ -nabrane ploče uspostavljaju se intermolekularne vodikove veze između karbonilne skupine i protona –NH skupine druge peptidne veze te su peptidni lanci povezani u izduženoj konformaciji. Navedene sekundarne strukture proteina povezuju se s petljama, okretima, vrpcama i drugim izduženim konformacijskim oblicima. Raspored sekundarnih struktura u prostoru određen je međusobnim

djelovanjem između bočnih aminokiselinskih ostataka. Međusobni raspored sekundarnih struktura u prostoru određuje tercijarnu strukturu polipeptidnog lanca.

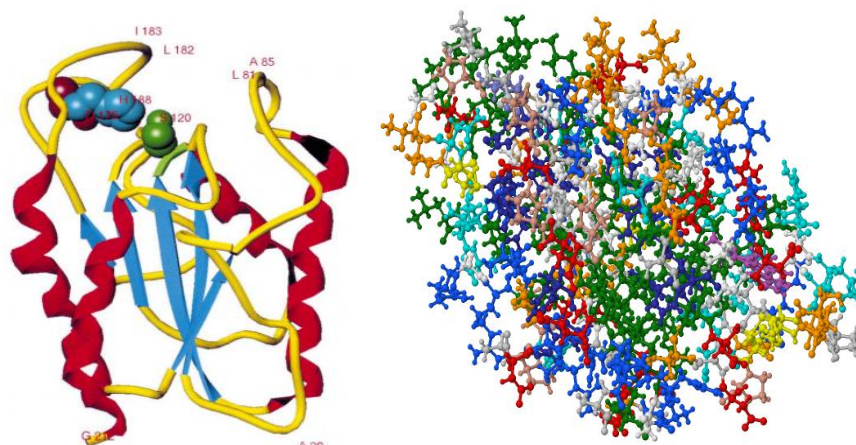
Katalitička reakcija na enzimima odvija se u katalitički aktivnom središtu enzima. Katalitički aktivno središte enzima sastoji se od nekoliko aminokiselinskih ostataka čije reaktivne skupine obuhvaćaju supstrat s nekoliko strana. Kod svih poznatih enzima katalitički aktivno središte smješteno je u procjepu ili udubljenju trodimenzionalne enzimske strukture. Zbog međumolekularnih djelovanja između enzima i supstrata dolazi do vezanja supstrata s enzimom u enzim-supstrat kompleks, a prilikom toga dolazi do konformacijskih promjena enzima i supstrata. Nakon stvaranja enzim-supstrat kompleksa katalitički aktivno središte enzima poprima komplementarnu strukturu prema strukturi prijelaznog stanja molekule supstrata. Na taj način znatno se smanjuje energija aktivacije reakcije.

### 2.3.1. Kutinaza

Kutinaze su hidrolitički enzimi koji kataliziraju reakciju hidrolize kutina ( kutin – strukturni poliester koji izgrađuje kutikulu biljaka). Osim kutina, kutinaze kataliziraju reakciju hidrolize esterske veze nekih od sintetskih polimera te esterske veze triglicerida.[19] U literaturi je zabilježeno katalitičko djelovanje kutinaze na hidrolizu esterskih veza u poli( $\epsilon$ -kaprolakton-u)[20], poli(etilen-tereftalat-u).[19] Kutinaza, izvanstanični enzim kojeg luči gljiva *Fusarium sloani*, je  $\alpha/\beta$  protein s jednom domenom te sadrži 197 aminokiselinskih ostataka. Kutinaza gljive *Fusarium solani* najčešće je istraživana kutinaza te joj je određena trodimenzionalan struktura rentgenskom difrakcijom. Glavne dijelove prostorne strukture kutinaze čini pet paralelnih  $\beta$ -nabranih ploča koje su lagano zakrivljene, a oko njih se nalaze četiri  $\alpha$ -uzvojnice (slika 8). Kutinaza spada u skupinu hidrolaza i podskupinu serin esteraza za koje je karakteristično da se katalitički aktivan serin nalazi na okretu koji spaja C-terminalni kraj  $\beta$ -nabrane ploče i  $\alpha$ -uzvojnici. Osim serina (Ser 120) katalitički aktivnu trijadu čine asparaginska kiselina (Asp 175) i histidin (His 188). Navedena katalitički aktivna triada također je karakteristična za lipaze i esteraze. Kutinaza se smatra poveznicom između lipaza i pravih esteraza.[21] Za lipaze je karakteristično da kataliziraju hidrolizu esterskih veza kod netopljivih triglicerida koji sadrže dugolančane masne kiseline, dok je za esteraze karakteristično da kataliziraju hidrolizu esterskih veza kod triglicerida koji sadrže masne kiseline s kratkim lancima, ne duljim od šest ugljikovih atoma. [22] Osim toga djelovanje lipaza određeno je međupovršinskom aktivacijom to jest međudjelovanjem lipaza s nepolarnom površinom triglicerida na međupovršini trigliceridi/voda znatno se povećava aktivnost lipaza. Prema tom, aktivnost lipaza je neznatna ispod kritične micelarne koncentracije, dok se znatno povećava iznad kritične micelarne koncentracije. Kutinaza pokazuje znatnu aktivnost iznad kritične micelarne koncentracije, ali i ispod kritične micelarne koncentracije. Kutinaza pokazuje veću



katalitičku aktivnost u reakcijama hidrolize triglicerida koji se sadrže kratkolančane masne kiseline.[21]



**Slika 8.** Prikaz trodimenzijske strukture kutinaze [21],[23]

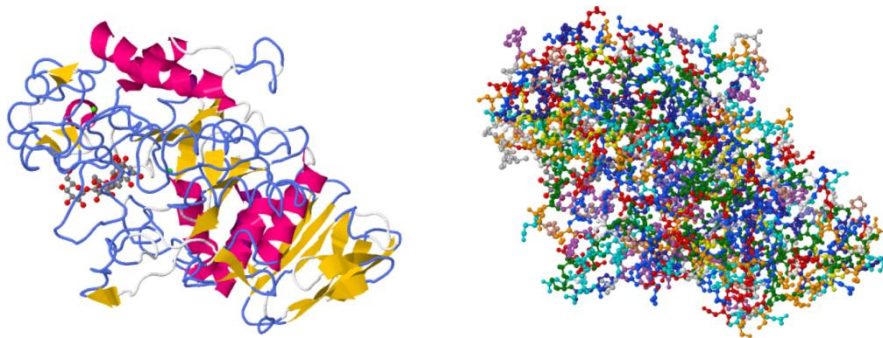
Katalitički aktivan Ser 195 nalazi se na dnu procjepa kojeg formiraju dvije kratke petlje koje sadrže hidrofobne aminokiselinske ostatke. Uloga petlji oko katalitički aktivnog mjesta koje sadrže hidrofobne aminokiselinske ostatke je vezanja supstrata. Za razliku od lipaza kod kojih se katalitički aktivno mjesto nalazi ispod petlje, katalitički aktivno mjesto kutinaze otvoreno prema otapalu. Pretpostavlja se da je to razlog što djelovanje kutinaze nije određeno međupovršinskom aktivacijom te kutinaza pokazuje katalitičku aktivnost pri hidrolizi triglicerida s kratkolančanim masnim kiselinama ispod kritične micelarne koncentracije.

Prilikom katalize reakcije hidrolize Ser 195 ima ulogu nukleofila, dok His 188 sudjeluju u reverzibilnom prijenosu protona. Na petlje koje formiraju procjep oko katalitički aktivnog mjesta veže se supstrat, a nakon vezanja supstrata na enzim, Ser 195 nukleofilno napada karbonilnu skupinu supstrata. Prilikom nukleofilnog napada His 188 preuzima proton od Ser 195, dok Asp 175 stabilizira ovo prijelazno stanje. Iz planarne esterske veze nastaje tetraedarski prijelazni oblik kovalentno povezan sa Ser 195. Nukleofilnim napadom Ser 195 na karbonilnu grupu kod tetraedarskog prijelaznog stanja dolazi do nastajanja oksianiona. Nastali oksianion stabilizira je vodikovim vezama unutar oksianionske šupljine koju tvore atomi dušika glavnog proteinskog lanca sa svojim vodikovim atomima. Nakon relaksacije prijelaznog stanja supstrat ostaje kovalentno vezan preko esterske veze s enzimom (enzim-supstrat kompleks). Nukleofilnim napadom vode na karboksilnu skupinu oslobađa se enzim iz enzim-supstrat kompleksa.[18] [19] [21]

### 2.3.2. $\alpha$ -amilaza

$\alpha$ -amilaze su enzimi koji kataliziraju reakciju hidrolize  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glikozidne veze u molekulama škroba te se svrstavaju u skupinu hidrolaza i podskupinu glikozidaza.  $\alpha$ -amilaza je široko rasprostranjen enzim u prirodi s obzirom da je škrob jedan od najrasprostranjenijih

ugljikohidrata te služi kao izvor energije za životinje, biljke i mikroorganizme.[24] U ljudskom organizmu  $\alpha$ -amilaza nalazi se u slini te je luči gušterača prilikom probave hrane.  $\alpha$ -amilaza je enzim koji se sastoji od proteinskog dijela (apoenzim) te od neproteinskog dijela enzima (prostetičke skupine), slika 9. Funkciju prostetičke skupine u  $\alpha$ -amilazi ima ion kalcija te je  $\alpha$ -amilaza enzim aktiviran metalom.[25] Aktivnost  $\alpha$ -amilaze ovisi o koncentraciji kalcijevih iona u otopini.[26] Sekvencija aminokiselina proteinskog dijela  $\alpha$ -amilaze znatno se razlikuje kod  $\alpha$ -amilaza iz različitih izvora. Veću sličnost  $\alpha$ -amilaze iz različitih izvora pokazuju u trodimenzionalnoj strukturi. Proteinski dio enzima  $\alpha$ -amilaze sastoji se od jednog polipeptidnog lanca s oko 500 aminokiselinskih ostataka. Prostorna struktura  $\alpha$ -amilaza sastoji se od tri domene (A, B, C) od kojih je domena A najveća. Karakteristika domene A je osam paralelno poredanih  $\beta$ -nabranih ploča koje formiraju cilindar oko kojeg se nalaze koncentrično poredano osam  $\alpha$ -uzvojnica. U  $\alpha$ -amilazi iz ljudske gušterače u domeni B je vezan ion kalcija, dok je u domeni A vezan ion klora. Uloga iona kalcija u domeni B je povezivanje s domenom A te stabilizacija katalitički aktivnog centra koje se nalazi u domeni A. Katalitički aktivan centar  $\alpha$ -amilaza čini tirada Asp (asparaginska kiselina)-Glu (glutaminska kiselina)-Asp (asparaginska kiselina). [25]



**Slika 9.** Prikaz trodimenzijske strukture  $\alpha$ -amilaze [23 a]

## 2.4. Želatina

Želatina je proizvod dobiven djelomičnom hidrolizom kolagena dobivenog iz životinjskih tkiva kao što su koža i kosti[27]. Kolagen luče najčešće stanice vezivnog tkiva, ali i druge vrste stanica, u obliku lančastih proteina koji potom poboljšavaju vezanje, odnosno mehanička svojstva tom ili nekom drugom tkivu. Želatina se može dobiti kiselom obradom sirovog kolagenskog materijala (tip A) i baznom obradom (tip B)[28]. Želatina kao takva ne postoji u prirodi te se smatra derivatom. Sastavljena od velikih i kompleksnih polipeptida različitih molekularnih masa. Kolagen su isprepleteni lanci polipeptida povezanih vodikovim vezama. Karakteristično obilježje kolagena je njegova trostruka zavojnica, koju čine tri lijevo zavijena polipeptidna lanca. Struktura želatine je slična strukturi kolagena no kod nje lanci nisu potpuno povezani zbog hidrolize, već su odvojeni.  $\alpha$  lanac želatine se u otopini ponaša kao slučajno

orijentirani polimer, dok se u gelu nalazi 70 % helikoidalne konformacije. Ostale molekule povezuju helikoidalna područja i čine matricu gela. Želatina se počinje razgrađivati iznad 100 °C, no za potpunu razgradnju potrebne su temperature iznad 500 °C. Stabilnost ovisi o pH i vrsti elektrolita i smanjuje se s povećanjem temperature zbog hidrolize. Želatina se najčešće koristi kao otopina pa je njezina topljivost vrlo važno svojstvo. Topiva je u vodi i u vodenim otopinama polialkohola kao što su glicerol ili propilen–glikol. Topljiva je i u vrlo polarnim otapalima s izraženom tendencijom stvaranja vodikovih veza, kao što su octena kiselina, trifluoretanol, formamid i dušična kiselina[29]. Najčešće se koristi kao dodatak hrani gdje djeluje kao ugušćivač, u farmaceutskoj industriji gdje se koristi kao film za tablete, za fotografske emulzije, te tehničke želatine koje se koriste za razne obloge, u proizvodnji papira, procesima printanja, kao adhezivi, u kozmetici itd[28]. Razlozi za odabir ovog materijala za mješavinu s PCI-om su njegovi dugi lanci (oko 300 nm) te njegova topljivost u vodi odnosno –OH skupine na želatininim lancima. Zbog toga dolazi do dobre adsorpcije otopine enzima na naš uzorak kojeg enzimi razgrađuju, preferirano želatinu. Također, ideja je umješavanjem želatine u PCL kontrolirati brzinu degradacije uzoraka te mješavine što će biti prikazano u daljnjem dijelu rada.

## **2.5. Površinske metode karakterizacije**

### **2.5.1. FTIR-ATR spektroskopija**

FTIR-ATR Infracrvena spektroskopija: Prigušena totalna refleksija (*eng. Infrared spectroscopy: Attenuated total reflection - ATR*)

ATR tehnika omogućuje stvaranje mape i dubine profila raspodjele funkcionalnih grupa preko površine ili na udaljenosti od površine uzorka. U karakterizaciji područja površine u istraživanjima koja su obično povezana s adhezijom potrebni su eksperimenti koji uključuju refleksiju. Refleksijska infracrvena spektroskopija površine može se provesti primjenom prigušene unutarnje refleksije (ATR) kada je uzorak relativno mekan materijal s niskim indeksom loma. ATR tehnikom dobivamo pikove na istoj valnoj duljini kao kod IR i FTIR tehnike, ali intenzitet može biti drugačiji. Dubina penetracije je reda veličine oko mikrometra. ATR nije osjetljiva kao druge površinske analize. ATR je kao i druge vrste infracrvene spektroskopije vrlo osjetljiva metoda za identifikaciju funkcionalnih grupa i stoga je moćna tehnika za karakterizaciju površine polimera.

### **2.5.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)**

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) temelji se na identifikaciji sekundarnih elektrona, koji se oslobađaju od površine kod prijelaza elektronske zrake po točkama površine vodljivog uzorka smještenog u koloni pod vakuumom. SEM slika nastaje kada se sekundarni elektroni emitiraju od područja površine uzorka i sakupljaju u supstanci koja apsorbira visoku

energiju zračenja. Stvoreni signal koristi se za kontrolu stvaranja slike na ekranu katodne cijevi pomoću modulacije jačine osvjetljenja zrake u skladu s podacima na ekranu. Rezultati kontrasta od topografije površine uzorka na SEM slici koja se može zabilježiti daje snažan dojam i uvid u prostorne dubine uzorka. Osim vrlo dobre razlučivosti, prednost je SEM-a velika dubina polja pri svim povećanjima, koja je zahvaljujući malom aperturnom kutu nekoliko puta veća nego u optičkoj mikroskopiji. Za stvaranje slike u SEM-u također se mogu rabiti elastično odbijeni elektroni (*engl. backscattered electrons*), koji izgube samo manji dio svoje izvorne energije međudjelovanjem s uzorkom. Uzorci koji se analiziraju SEM tehnikom moraju biti vodljivi kao što su metali radi analize sekundarnih elektrona s površine. Organski uzorci koji nisu vodljivi trebaju se prethodno prekriti tankim slojem zlata ili drugog metala raspršivanjem i vakuum naparavanjem.

### **2.5.3. Mjerenje kontaktnog kuta**

Poznavanje kontaktnog kuta testne kapljevine na površini ispitivanog uzorka omogućava izračunavanje slobodne energije površine ispitivanog uzorka. Određivanje kontaktnog kuta provodi se upotrebom uređaja goniometra. Mjerenje se provodi testnim kapljevina poznatih vrijednosti energija površine. Mjeri se kut kapi na površini uzorka koji zajedno s energijom površine poznatih kapljevina i računanjem pomoću modela (Owens-Wendt-Kaeble model, Wu model i van Oss model) daje vrijednost energije površine uzorka. Goniometar preko video sustava projicira sliku kapljice na zaslon računala, te određuje poziciju kapljice s točnošću od  $\pm 1$  mm. Kut može varirati od 0 do 180 ° ovisno o razlici energija površina. U ovom radu kontaktni kut mjeren je metodom viseće kapi, odnosno Sessile drop metodom. Sessile drop metoda ili metoda viseće kapi - kada kap tekućine dođe u kontakt s čvrstom ravnom površinom, kapljica formira određeni oblik. Kontaktni kut se mjeri između osnovne ravnine (dodirne površine tekućine i krute tvari) i tangente kapljice na granici triju faza (čvrsto, tekuće i plinovito).

## **2.6. Toplinske metode karakterizacije**

### **2.6.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)**

Diferencijalna pretražna kalorimetrija jedna je od glavnih metoda toplinskog ispitivanja polimernih materijala. Brza je metoda i za analizu je potrebna mala količina uzorka (nekoliko miligrama). Toplinska analiza DSC-om zasniva se na zagrijavanju ili hlađenju uzorka i inertnog, referentnog materijala programiranom brzinom. Pritom se izravno mjeri diferencijalna toplina,  $dH/dt$ , potrebna da se razlika temperatura između ispitivanog i referencijskog uzorka svede na nulu. Mjeri se razlika dovedene energije ispitivanom i referentnom uzorku kao funkcija temperature (koja je programski definirana). Količina topline (energije) koju je potrebno uzorku

dovesti ili odvesti da bi se održala konstantna razlika temperatura između ispitivanog referentnog uzorka registrira se kao pik na DSC krivulji, a ta vrijednost je u svakom trenutku ekvivalentna brzini apsorpcije ili oslobađanja energije u uzorku. Metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije mogu se odrediti specifični toplinski kapacitet ( $C_p$ ), promjena specifičnog toplinskog kapaciteta ( $\Delta C_p$ ), temperature faznih prijelaza (talište ( $T_m$ ), staklišt ( $T_g$ ), kristalište ( $T_c$ ), topline faznih prijelaza (toplina kristalizacije,  $\Delta H_c$ ; toplina taljenja,  $\Delta H_t$ ), kao i podatci o kemijskim reakcijama (polimerizaciji, oksidaciji, razgradnji).

### **2.6.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)**

TGA je analitička tehnika kojom se prati promjena mase uzorka u ovisnosti o temperaturi i/ili vremenu, tijekom programiranog zagrijavanja uzorka u uvjetima kontrolirane atmosfere (dušik, zrak). Uređaj koji prati promjenu mase naziva se termovaga. Metoda daje informacije o toplinskoj stabilnosti (razgradnji) ispitivanog uzorka. Termogravimetrijska metoda omogućava praćenje fizikalnih pojava (npr. hlapljenje, sublimaciju, sorpciju) te kemijskih pojava i reakcija koje se zbivaju uz gubitak mase tvari. Osim mjerenja promjene mase uzorka u ovisnosti o temperaturi (dinamička termogravimetrija) ili u ovisnosti o vremenu (izotermna termogravimetrija) uređaj bilježi i prvu derivaciju mase uzorka po temperaturi  $dm/dT$ , odnosno po vremenu  $dm/dt$  (diferencijalna dinamička odnosno izotermna krivulja). Također se iz ne sagorjelog ostatka može odrediti udio anorganskog punila u kompozitnim materijalima.

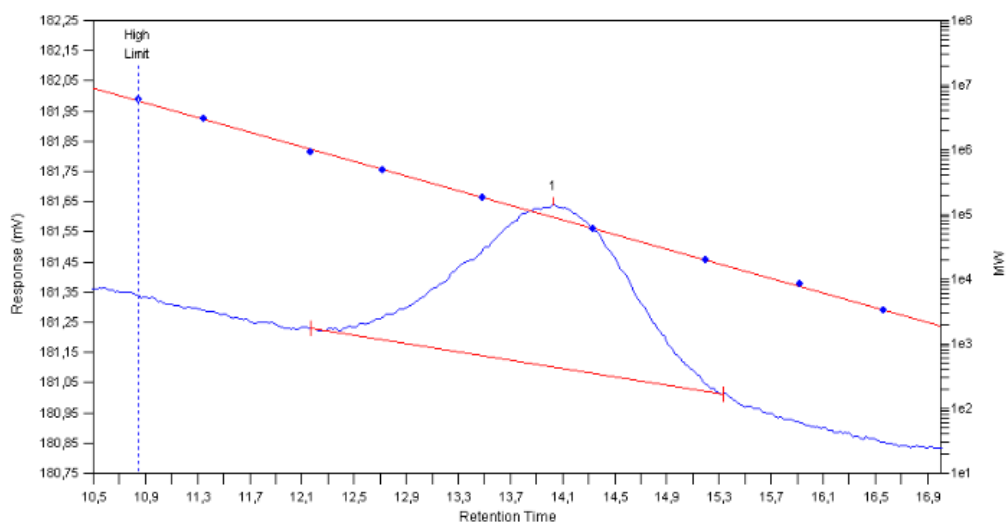
### **2.7. Mehanička svojstva materijala**

Mehanička svojstva predstavljaju važan kriterij ocjene kvalitete i primjenskih svojstava materijala. Ponašanje materijala pod djelovanjem vanjskog opterećenja odraz su njihove strukture. Važnija metoda ispitivanja utjecaja sile naprezanja na deformaciju i sklonost materijala prema kidanju, jest njihovo djelovanje na produljenje epruvete, koje se naziva i rasteznim ispitivanjem. Kako bi se odredila mehanička svojstva materijala, epruvete (uzorci) se podvrgavaju vlačnom naprezanju na kidalici. Podvrgavaju se postepenom porastu jednoosnog opterećenja sve do njezinog loma, odnosno kidanja, pri tome kidalica mora osigurati jednako prenošenje sile na epruvetu u uzdužnom pravcu uz istovremeno praćenje opterećenja, kao i izrada dijagrama. Uzorak materijala koji se ispituje obradi se na određeni oblik i dimenzije propisane standardima. Tako pripremljene uzorke zovemo epruvetama. Za ispitivanje čvrstoće koriste se epruvete kružnog, kvadratnog i pravokutnog presjeka. Površina tijela mora biti dobro obrađena bez ogrebotina i tragova obrade, jer u suprotnom pukotine i oštećenja su slabo mjesto u strukturi kod kojeg dolazi do popuštanja. Takvo dobiveni rezultati ne prikazuju prave vrijednosti.

## 2.8. Određivanje raspodjele molekularnih masa

### 2.8. 1. Kromatografija isključenja po veličini (SEC)

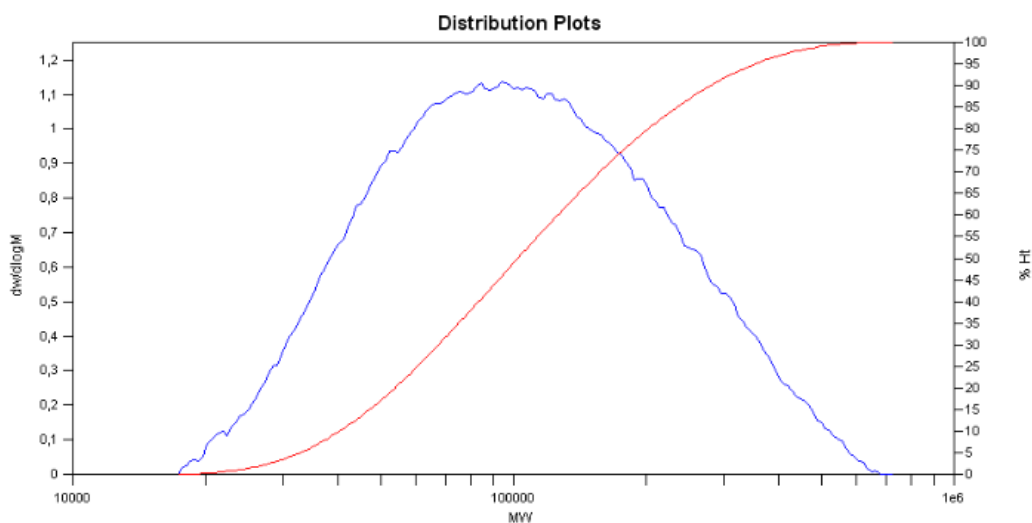
Kromatografija isključenja po veličini (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC), ili, kako se često naziva, kromatografijom na propusnom gelu (engl. *Gel Permeation Chromatography*, GPC) je metoda kojom se molekule u otopini/uzorku odvajaju na temelju njihove veličine ili molekulske mase. Odvajanje molekula na temelju njihove veličine ili molekulske mase odvija se u razdjelnoj koloni u kojoj se nalazi porozan gel umreženog polimera s određenom raspodjelom veličine pora. Otopalo koje se nalazi u porama gela je stacionarna faza, a isto otopalo koje cirkulira konstantnim protokom kroz kolonu je mobilna faza-eluens. Na izlazu iz kolone prati se koncentracija polimera mjerenjem nekog prikladnog fizikalnog svojstva, kao na primjer indeksa loma ili apsorpcije elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom području. Odziv detektora povezan je s koncentracijom polimera, a također je funkcija volumena eluiranja. Ovisnost molekulske mase o volumenu eluiranja određuje se baždarenjem s polimerim uzorcima poznatih i vrlo uskih raspodjela molekularnih masa. Separacija polimernih molekula u razdjelnoj koloni posljedica je različitog hidrodinamičkog volumena solvatomizirane polimerne molekule, a hidrodinamički volumen solvatomiziranih polimernih molekula raste s porastom molekulske mase. Prikaz kromatograma kromatografije isključenja po veličini dan je na slici 10.



**Slika 10.** Prikaz kromatograma kromatografije isključenja po veličini

Ovisnost molekulske mase o volumenu eluiranja određuje se baždarenjem s polimernim uzorcima poznatih i vrlo uskih raspodjela molekularnih masa. Separacija polimernih molekula u razdjelnoj koloni posljedica je različitog hidrodinamičkog volumena solvatomizirane polimerne molekule, a hidrodinamički volumen solvatomiziranih polimernih molekula raste s porastom molekulske mase. Otopljene polimerne molekule čiji je hidrodinamički volumen veći od najveće pore gela ne difundiraju u gel te prve izlaze iz kolone, dok polimerne molekule s manjim

hidrodinamičkim volumenom difundiraju u pore gela te je njihovo vrijeme zadržavanja u koloni duže. Prikaz primjera rezultate određivanja raspodjele molekulskih masa SEC metodom dana je na slici 11.



**Slika 11.** Rezultati određivanja raspodjele molekulskih masa SEC metodom – diferencijalna (plavo) i integralna (crveno) krivulja raspodjele molekulskih masa

### 3. HIPOTEZA I OPĆI CILJEVI ISTRAŽIVANJA

PCL je hidrofoban polimer koji se sporo razgrađuje. Pretpostavka je da će se zamješavanjem PCL polimera s proteinskom hidrofilnom komponentom želatinom omogućiti prodor otopine u unutrašnjost materijala što će u konačnici rezultirati bržom hidrolitičkom razgradnjom, osobito uz prisutnost enzima.

Svrha ovog rada bila je istražiti utjecaj proteinske komponente želatine na brzinu enzimske razgradnje poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) kako bi se dobio materijal zadovoljavajućih svojstava, definirane brzine razgradnje koji bi mogao naći primjenu za izradu elemenata za fiksaciju koštanog tkiva.

Specifični ciljevi ovog rada bili su:

- istražiti utjecaj enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze na brzinu razgradnje PCL-a
- istražiti utjecaj proteinske hidrofilne komponente želatine (koja lako bubri u vodenom mediju) kao potencijalnog „nosača“ otopine u unutrašnjost materijala i na taj način ubrzati razgradnju kroz cijeli presjek
- utvrditi mehanizam djelovanja enzima u ovisnosti o sastavu mješavine
- uvođenjem proteinske komponente utjecati na promjenu brzine razgradnje PCL-a



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

#### Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL)

- komercijalni biorazgradivi polimer koji nalazi široku primjenu za različite namjene.

U radu je korišten PCL polimer Polycaprolactone, Capa 6800, Perstorp, UK - linearni poliester visoke molekularne mase, kompatibilan s velikim brojem termoplasta, topljiv u uobičajenim otapalima. Tipična fizikalna i mehanička svojstva Polycaprolactone, Capa 6800 prikazana su u tablici 1.

**Tablica 1.** Fizikalna i mehanička svojstva Polycaprolactone, Capa 6800

Fizikalna svojstva			
gustoća (g cm <sup>-3</sup> )	MFR, g/10 min (160°C, 5 kg)	talište (°C)	staklište (°C)
1,145	35	58 - 60	55-60

Mehanička svojstva	
Rastezna čvrstoća (MPa)	Prekidno istezanje(%)
20	800

#### Želatina

Želatina korištena u radu je G1890 Gelatin dobivena iz svinjske kože, čvrstoće gela ~300 g Bloom, Tip A koji se koristi kao bioreagens, te za elektroforezu i za kulturu stanica, proizvođača Sigma Aldrich.

#### Fosfatom puferirana otopina soli (PBS) (engl. *phosphate buffered saline*)

Za pripremu otopine korištene su sljedeće kemikalije:

Natrijev klorid, p.a. čistoće, Gram Mol

Kalijev klorid, p.a. čistoće T.T.T. d.o.o.

Natrijev hidrogen fosfat, p.a. čistoće, Sigma Aldrich

Kalijev dihidrogen fosfat, p.a. čistoće, Sigma Aldrich

Deionizirana voda

## Enzimi

Kutinaza, Novozym 435, Novozymes 20 mg/L

$\alpha$ -amilaza, BEISOL LZV CHT Bezema 20 mg/L

ostale kemikalije

- toluen, T.T.T. d.o.o., p.a. čistoće

## 4.2 Priprava PCL/GEL mješavina

PCL/GEL mješavina sastava 90% PCL i 10% želatine pripravljena je u laboratorijskom uređaju za zamiješavanje u talini, Brabender gnjetilici, slika 12., umješavanjem pri temperaturi od 140 °C i brzini okretaja gnjetila 60 o/min. PCL i želatina zamiješavani su tijekom 15 min, a zatim je mješavina izvađena iz gnjetilice, usitnjena te hlađena na sobnoj temperaturi.



**Slika 12.** Brabender gnjetilica

Dobivena talina prebačena je na teflonsku podlogu i usitnjena rezanjem. Pločice PCL polimera i PCL/GEL mješavine dimenzija 10 x 10 cm pripravljene su prešanjem na hidrauličkoj preši, Dake (slika 13.) pri temperaturi od 140°C i tlaku od 135 bara u trajanju od 7 min uz predgrijavanje od 2 min i prešanje 5 min. Nakon toga uzorci su hlađeni pod tlakom, do 50 °C, te izvađeni iz kalupa.



**Slika 13.** Hidraulička preša Dake

### 4.3 Priprava fosfatom puferirane otopine soli (PBS)

Fosfatom puferirana otopina soli pripravljena je u odmjernoj tikvici volumena 500 ml, prema sljedećoj recepturi, tablica 2.:

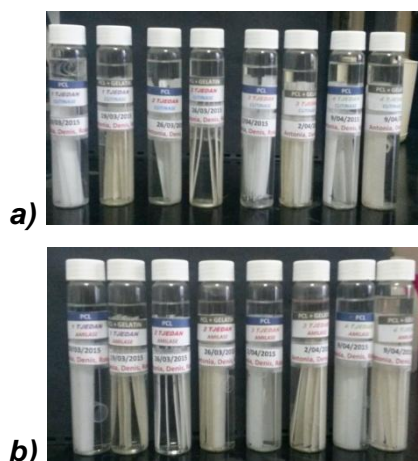
**Tablica 2.** Komponente soli za pripravu PBS otopine

komponenta	m / g
NaCl	4
KCl	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12

Navedene količine soli odvagane su i dodane u odmjernu tikvicu s 400 ml deionizirane vode. Nakon otapanja soli, tikvica je nadopunjena vodom do oznake. pH vrijednost pripravljene otopine iznosila je 7,4.

### 4.4 Postupak hidrolitičke razgradnje

U 500 ml fosfatom puferiranu otopinu soli dodano je 2,5 ml otopine enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze koncentracije 20 mg/L. Uzorci PCL-a i mješavine PCL/GEL dimenzija 1x10 cm su izvagani i stavljeni u bočice s PBS otopinom s enzimom, slika 14. U svaku bočicu je postavljeno 5 pločica, s razmakom od 1 mm između pojedine pločice. Hidrolitička razgradnja u PBS otopini enzima inkubirana je na 37 °C, tijekom različitih vremena (4 tjedna). Nakon 168, 336, 504, 672 uzorci su izvađeni iz otopine, isprani destiliranom vodom te osušeni na filtarskom papiru. Uzorci su zatim sušeni do konstantne mase na sobnoj temperaturi.

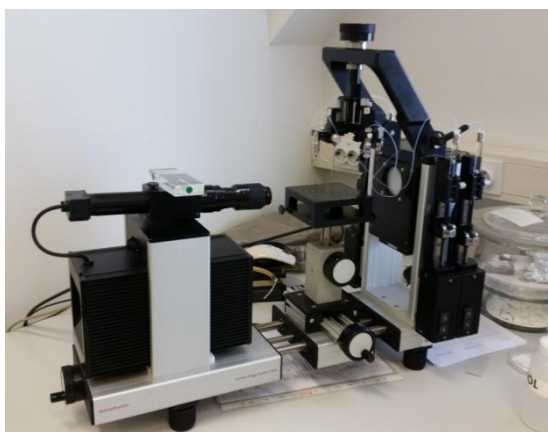


**Slika 14.** Uzorci PCL i PCL/GEL pločica pripremljeni za hidrolitičku razgradnju, inkubacijom pri 37°C tijekom 4 tjedna a) u fosfatnoj PBS otopini enzima kutinaze i b) u fosfatnoj PBS otopini enzima  $\alpha$ -amilaze

Kako bi se utvrdila promjena mase uvjetovana razgradnjom, uzorci su vagani prije postavljanja u otopinu i nakon sušenja. Kao rezultat dobiven je maseni udio (%) razgrađenog polimera.

#### 4.5. Mjerenje kontaktnog kuta

Mjerenja kontaktnog kuta provedena su na uređaju DataPhysics OCA 20 Instruments GmbH, slika 15. Kako bi se utvrdile promjene hidrofobnosti/hidrofilnosti uvjetovane razgradnjom kao testna kapljevina korištena je voda. Kontaktni kut je mjereno na 5 različitih mjesta, a vrijednost kontaktnog kuta je izračunata kao prosječna vrijednost. Na pločici PCL-a i želatine mjereno je kontaktni kut s diiodometanom i glicerolom kao testnim kapljevinama. Sva mjerenja provedena su pri temperaturi od 23°C.



**Slika 15.** Goniometar, instrument za mjerenje kontaktnog kuta, DataPhysics OCA 20 Instrument

**Tablica 3.** Vrijednosti disperzijske i polarne komponente slobodne površinske energije i ukupna vrijednost slobodne površinske energije

Kapljevina	Komponente slobodne površinske energije*		
	$\gamma^d$	$\gamma^p$	$\gamma$
dijodometan	50,80	0	50,80
glicerol	37,00	26,40	63,40

\*vrijednosti prema Stromu

#### 4.6. Infracrvena spektroskopija (FTIR-ATR)

FTIR-ATR spektri PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon različitih vremena izlaganja hidrolitičkoj razgradnji u PBS otopini s enzimima snimljeni su u području od 600 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  pomoću Perkin Elmer Spectrum One Spectrometer spektrometra koristeći Single Reflection ATR System, slika 15. Spektri su snimljeni rezolucijom 4  $\text{cm}^{-1}$  akumulirajući rezultat 4 skena.



**Slika 16.** FTIR spektrometar, Perkin Elmer Spectrum One Spectrometer s ATR komorom

#### **4.7 Određivanje raspodjele molekulskih masa**

Određivanje molekulske mase PCL-a i mješavine PCL/želatina provedena je na uređaju PL-GPC 20 Polymer Laboratories, opremljenim refraktometarskim osjetilom, slika 17. Razdjelnu jedinicu čine dvije serijski povezane kolone ispunjene poli(stiren/divinilbenzen) kopolimernim gelom veličine čestica 3 – 100  $\mu\text{m}$ . Uzorci su pripremljeni otapanjem 30 mg ispitivanih polimera u 5 ml toluena te su ostavljeni 7 dana da bi se ispitivani polimeri što bolje otopili. Određivanje molekulskih masa provedeno je pri protoku toluena kroz kolonu od 1ml/min. Molekulske mase određene su s baždarne krivulje dobivene s polistirenom kao standardom.



**Slika 17.** PL-GPC 20 Polymer Laboratories

#### **4.8. Diferencijalna pretražna kalorimetrija**

Ispitivanja toplinskih svojstava uzoraka provedeno je na uređaju Mettler Toledo DSC 822<sup>e</sup>. Uzorci mase ~ 10 mg, stavljeni su u aluminijske posudice i hermetički zatvoreni. Mjerenja su provedena pri brzini zagrijavanja/hlađenja 10 °C/min u temperaturnom području od -85 °C do

150 °C. Da bi svi uzorci imali jednaku toplinsku prošlost u prvom ciklusu su zagrijani na 150 °C brzinom zagrijavanja 10 °C/min te zatim hlađeni do - 85 °C brzinom hlađenja 10 °C/min. Nakon toga proveden je još jedan ciklus zagrijavanja/hlađenja pri jednakim uvjetima. Toplinska svojstva uzoraka ispitana su prije i nakon enzimske razgradnje. Kristalnost uzoraka određena je uz pretpostavku da je kristalnost uzorka proporcionalna toplini taljenja pri čemu je za 100 % kristalan PCL uzeta vrijednost toline taljenja 142,5 J/g [30]. Kristalnost je proračunata prema jednadžbi:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0(1 - w)} * 100 \%$$

gdje je  $X_c$  – kristalnost uzorka PCL-a,  $\Delta H_m$  entalpija taljenja,  $\Delta H_m^0$  entalpija taljenja 100 % PCL-a,  $w$  – maseni udio punila u mješavini. Na slici 18. prikazan je uređaj za diferencijalnu pretražnu kalorimetriju.



**Slika 18.** Uređaj za diferencijalnu pretražnu kalorimetriju

## 4.9 Termogravimetrijska analiza

Toplinska stabilnost uzoraka ispitana je na uređaju TA Instruments Q500, slika19. Mjerenje je provedeno pri brzini zagrijavanja 10 °C/min u temperaturnom području od 25 °C do 900 °C. Uzorci mase oko 10 mg zagrijavani su u otvorenom platinskom lončiću u inertnoj atmosferi N<sub>2</sub> u protok 60 ml/min. Toplinska razgradnja je praćena prije i nakon enzimske razgradnje uzoraka.



**Slika 19.** TA Instruments Q500

#### **4.10 Određivanje mehaničkih svojstava**

Eksperimentalno određivanje mehaničkih svojstava uzoraka provedeno je na univerzalnom uređaju za mehanička ispitivanja Zwick 1445. Mjerena su mehanička svojstva PCL-a i mješavine PCL/GEL prije i nakon enzimske razgradnje tijekom različitih vremena. Mjerenje je provedeno pri brzini rastezanja uzoraka 50 mm/min i razmaku čeljusti kidalice 35 mm. Sva mjerenja provedena su pri temperaturi 22 °C. Na slici 20. Prikazana je mehanička kidalica.



**Slika 20.** Mehanička kidalica

#### **4.11 Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)**

Mehanizam popuštanja i morfologija uzoraka praćeni su pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Mikrografije polimera rađene su na pretražnom elektronskom mikroskopu visoke rezolucije, tipa Tescan Vega serija 3, Bruker, Češka (slika 21.). Uzorci su snimljeni u visokom vakuumu. Prije snimanja uzorci su neparavani zlatom kako bi se osigurala vodljivost. U komori za uzorke tlak je bio  $10^{-5}$  Pa, a uzorci su snimljeni pri naponu od 10 kV i različitim povećanjima. Snimana je površina i mjesto kidanja čistih polimera PCL i PCL/GEL mješavina i nakon 4 tjedna razgradnje u PBS otopinama različitih enzima.



**Slika 21.** Pretražni elektronski mikroskop Tescan Vega serija 3, Bruker, uređaj za neparivanje vodljivog sloja zlata i napareni uzorci



## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Utjecaj enzimske razgradnje na promjenu mase

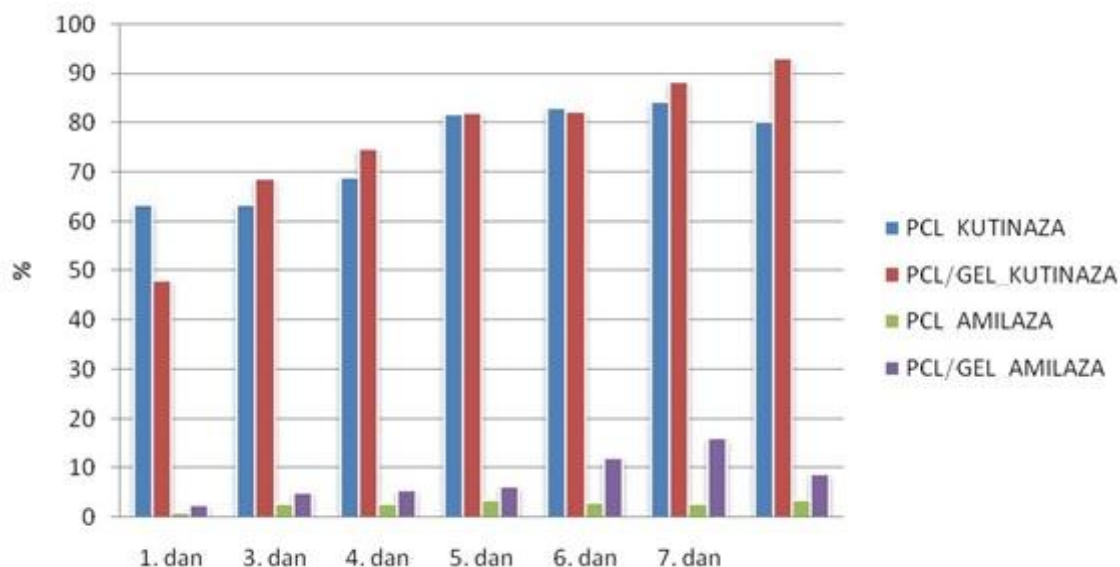
#### 5.1.1. Promjena mase tijekom 7 dana

Kako bi se utvrdilo da li je tijekom različitih vremena hidrolitičke razgradnje PCL polimera i PCL/GEL mješavine u PBS otopini enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze, došlo do razgradnje, u određenim vremenskim intervalima vađeni su uzorci iz otopine, sušeni i vagani, te je određena promjena mase.

Na slikama 22.-24. prikazan je gubitak mase uzoraka PCL polimera i PCL/GEL mješavine u ovisnosti o vremenu izlaganja tijekom 7 dana u fosfatnoj PBS otopini s kutinazom i  $\alpha$ -amilazom.

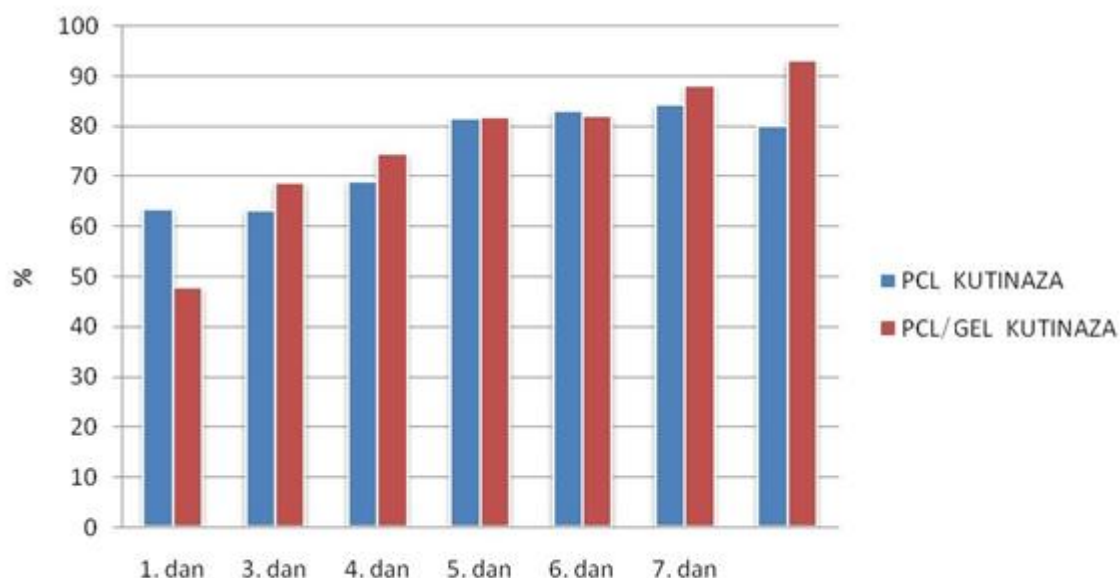
Vidljivo je da u PBS otopini s amilazom dolazi do neznatnog gubitka mase PCL polimera i PCL/GEL mješavine, što ukazuje na katalitičku aktivnos ovog enzima na PCL.

Iz prosjeka gubitka masa vidljivo je da je razgradnja PCL-a u kutinazi 27,5 puta brža nego PCL-a u amilazi. Brzina razgradnje mješavine PCL/GEL u kutinazi 9,5 puta je brža nego u amilazi. Vidljivo je da se od 1. do 5. dana kontinuirano povećava količina razgrađenog PCL-a, do 80% a nakon toga od 5. do 7. dana nema značajne promjene mase. Rezultati ukazuju na mogućnost vezivanja enzima kutinaze na površinu PCL-a što usporava daljnju razgradnju. Smanjenje brzine razgradnje 7. dana PCL-a u kutinazi i PCL/GEL u amilazi moguće je zbog smanjenja koncentracije enzima zbog vezivanja enzima za površinu polimera.

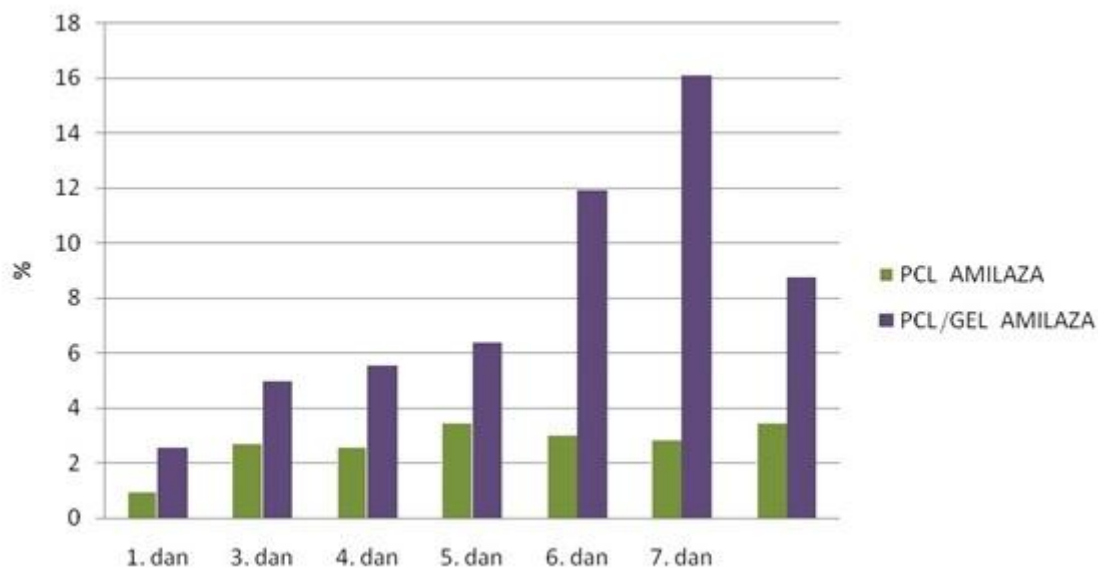


**Slika 22.** Promjena mase kroz 7 dana PCL-a i mješavine PCL/GEL u PBS otopini enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze

Na slici 22. može se vidjeti da je brža razgradnja PCL/GEL mješavina u odnosu na PCL polimer. Razlog je vjerojatno u povećanju hidrofилности i površine kontakta dodatkom želatine. Želatina lako bubri u vodenom mediju pa je za očekivati da otopina enzima lakše prođire kroz čitav presjek uzorka dok kod PCL polimera dolazi uglavnom do površinske erozije. Značajniji doprinos brzini razgradnje vidljiv je kod PCL/GEL mješavine u otopini amilaze, slika 24.



**Slika 23.** Promjena mase kroz 7 dana PCL-a i mješavine PCL/GEL u PBS otopini enzima kutinaze



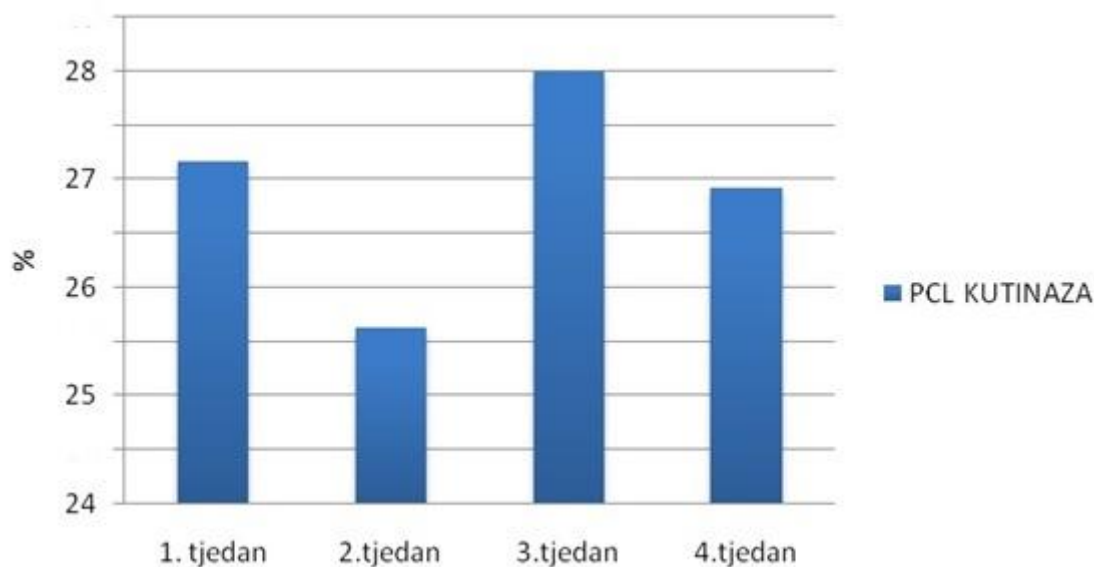
**Slika 24.** Promjena mase kroz 7 dana PCL-a i mješavine PCL/GEL u PBS otopini enzima  $\alpha$ -amilaze

### 5.1.2. Promjena mase tijekom 4 tjedna

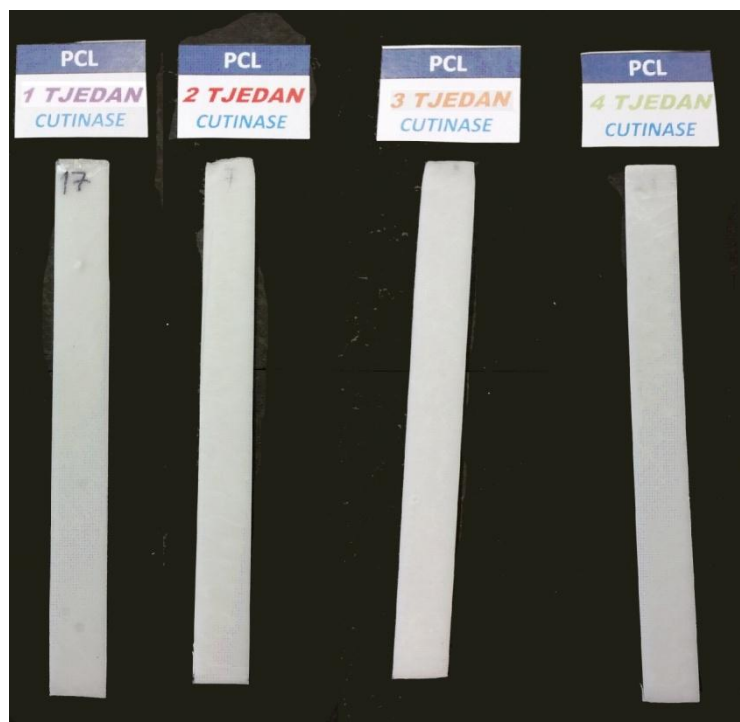
Na slikama 25.-32. prikazani su rezultati gubitka mase uzoraka PCL polimera i PCL/GEL mješavine u ovisnosti o vremenu razgradnje u PBS otopinama s enzimom kutinaze i amilaze.

Iz rezultata promjene mase vidljivo je da se tijekom 1. tjedna u PBS otopini kutinaze razgradi oko 27% PCL polimera (slika 25.) i oko 36% PCL/GEL mješavine (slika 27.). Daljnje izlaganje tijekom 4 tjedna ne rezultira daljnim porastom gubitka mase, što ukazuje na mogućnost vezivanja enzima na površinu uzoraka i stoga smanjene katalitičke aktivnosti enzima. Enzim kutinaze učinkovito razgrađuje PCL.

Uočava se diskontinuiran slijed razgradnje. Ako se dobiveni rezultati usporede s rezultatima razgradnje u PBS otopini enzima praćeni tijekom 7 dana na uzorcima manjih dimenzija i u većoj količini otopine gdje je razgrađeno oko 80% uzorka može se zaključiti da su geometrija uzorka i količina otopine u koju su uzorci uronjeni važni čimbenici brzine razgradnje. Na slici 26. su prikazani uzorci PCL-a u kutinazi nakon prvog, drugog, trećeg i četvrtog tjedna razgradnje.

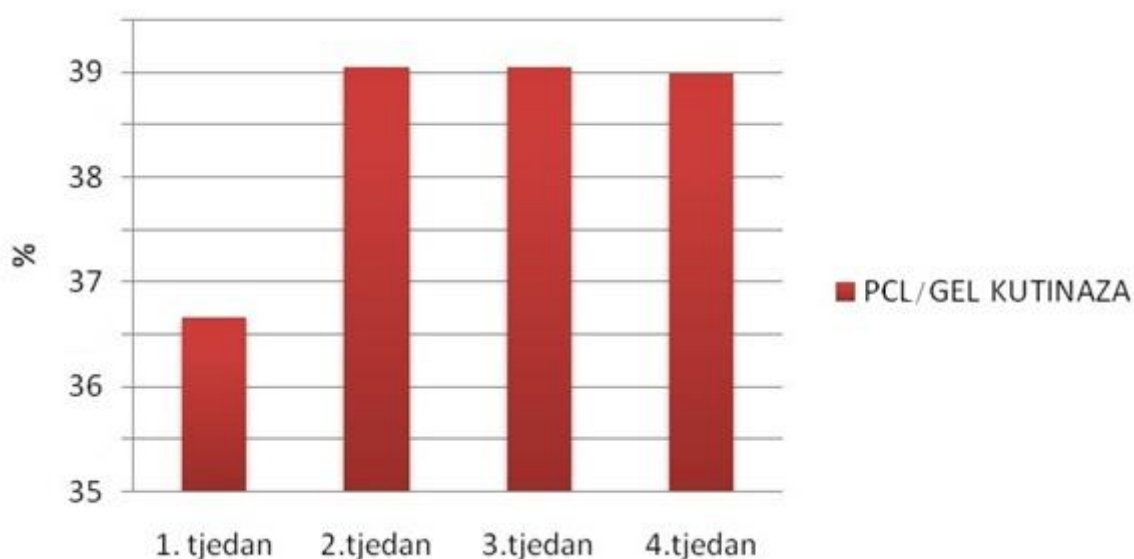


**Slika 25.** Promjena mase PCL polimera tijekom 4 tjedna u PBS otopini enzima kutinaze



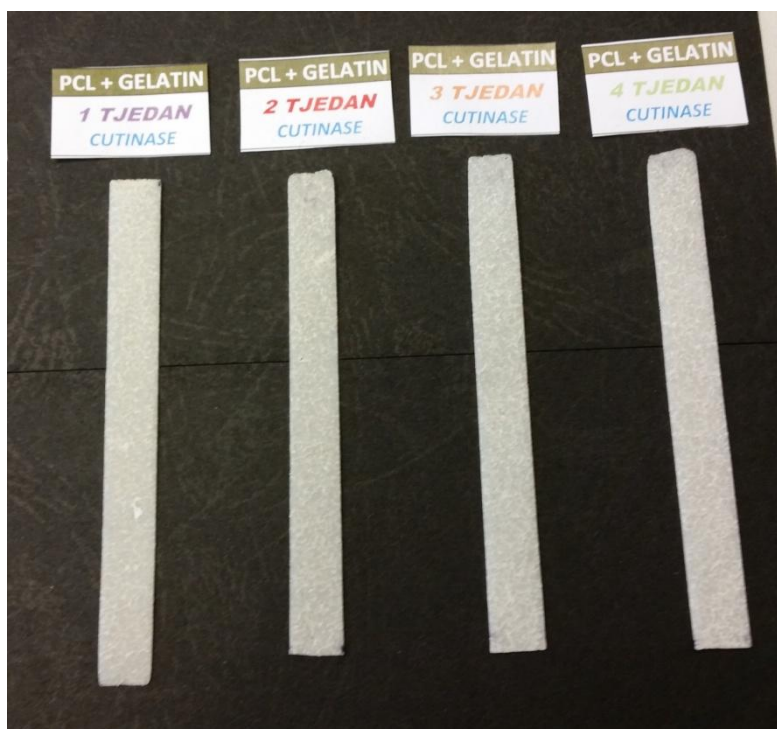
**Slika 26.** Uzorci PCL-a tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze

Na slici 27. su prikazane promjene mase (brzina razgradnje) PCL/GEL mješavine kroz 4 tjedna razgradnje u kutinazi. Uočava se nagli porast nakon prvog tjedna razgradnje te se pretpostavlja da je razlog tomu lakša razgradnja zbog već narušene strukture i veće površine. Blagi pad u 4. tjednu može se objasniti smanjenjem aktivnosti enzima. Ako se usporede postoci gubitka mase uočava se veći gubitak mase (brža razgradnja) kod PCL/GEL mješavine što je rezultat veće dodirne površine i hidrofilnosti uzorka.



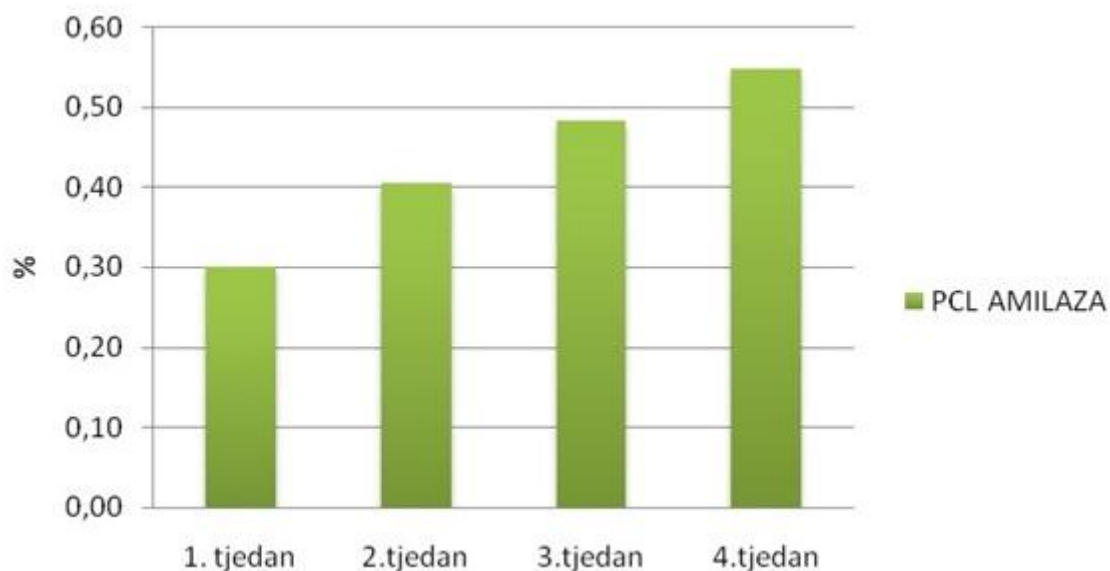
**Slika 27.** Promjena mase PCL/GEL mješavine tijekom 4 tjedna u PBS otopini enzima kutinaze

Na slici 28. su prikazani uzorci PCL/GEL mješavine u kutinazi nakon prvog, drugog, trećeg i četvrtog tjedna razgradnje. Uočava se razlika u strukturi usporedno sa čistim PCL polimerom u kutinazi što se može pripisati dodatku želatine koja je poboljšala razgradnju.

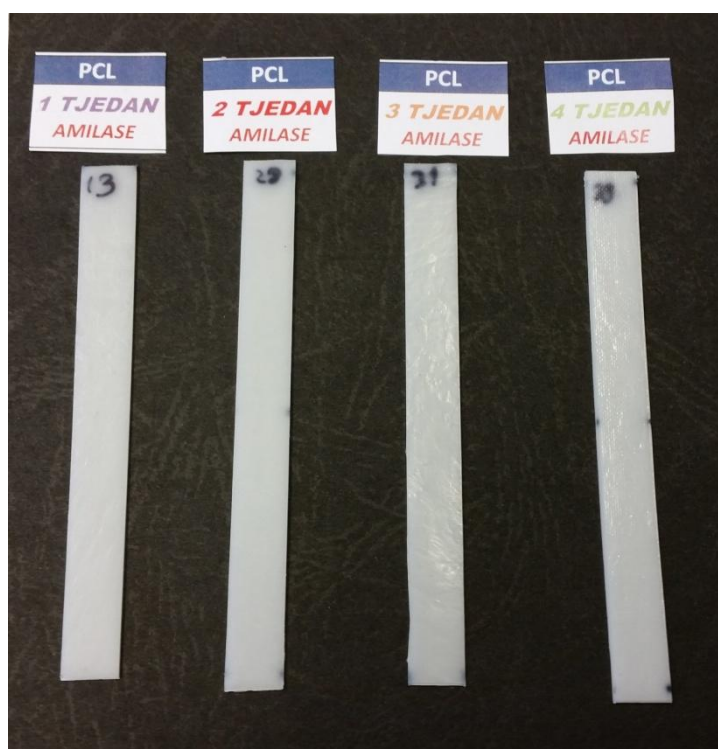


**Slika 28.** Uzorci PCL/GEL tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze

Na slici 29. su prikazane promjene mase (brzina razgradnje) PCL polimera kroz četiri tjedna razgradnje u amilazi. Postotak promjene mase je vrlo mali u odnosu na razgradnju u kutinazi. Razgradnja kroz 4 tjedna kontinuirano raste, ali vrlo blagim porastom. Gubitak mase nakon 4 tjedna iznosi svega oko 0,5% što ukazuje na malu brzinu razgradnje u prisutnosti amilaze. Na slici 30. su prikazani uzorci PCL-a u amilazi nakon prvog, drugog, trećeg i četvrtog tjedna razgradnje. Usporedno s uzorcima koji su bili u kutinazi vidljiva je očuvana struktura PCL-a.



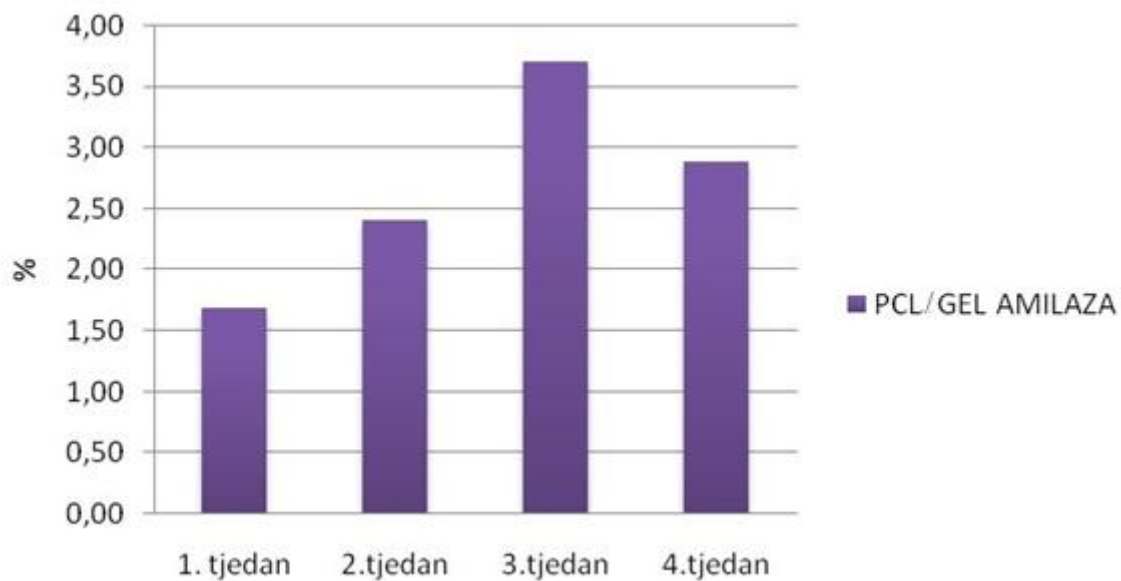
**Slika 29.** Promjena mase PCL polimera tijekom 4 tjedna u PBS otopini enzima  $\alpha$ -amilaze



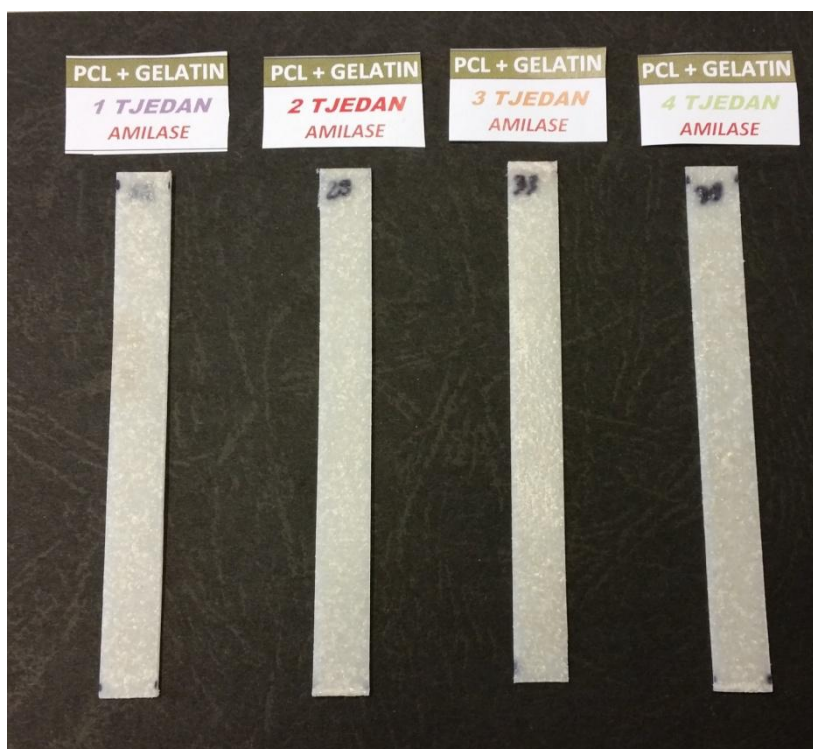
**Slika 30.** Uzorci PCL-a tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima amilaze

Na slici 31. su prikazane promjene mase (brzina razgradnje) PCL/GEL mješavine tijekom četiri tjedna razgradnje u amilazi. Postoci promjene mase (brzina razgradnje) kontinuirano raste a kroz 4 tjedna razgradi se oko 4% materijala. Očito je da želatina značajno dobrinosi promjeni brzine razgradnje PCL polimera. U 4. tjednu uočava se smanjenje, što ukazuje na mogućnost smanjene aktivnosti enzima. Na slici 32. su prikazani uzorci mješavine PCL/GEL u amilazi

nakon prvog, drugog, trećeg i četvrtog tjedna razgradnje. Usporedno sa uzorcima koji su bili u kutinazi vidljiva je očuvana struktura PCL-a.



**Slika 31.** Promjena mase kroz 7 dana PCL/GEL u PBS otopini enzima  $\alpha$ -amilaze



**Slika 32.** Uzorci PCL/GEL tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima  $\alpha$ -amilaze

### 5.1.3 Kromatografija isključenjem po veličini (SEC)

Kako bi se utvrdio mehanizam enzimske razgradnje polimernih uzoraka praćena je promjena molekulskih masa uzoraka tijekom različitih vremena razgradnje.

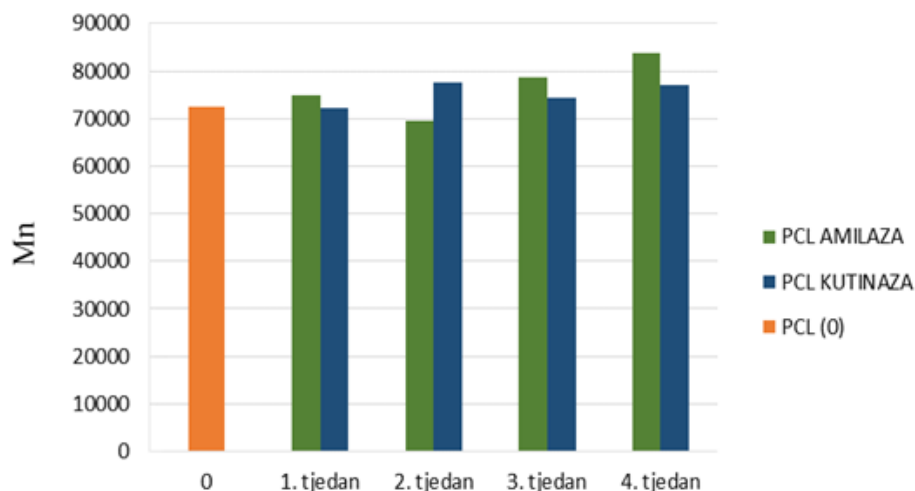
Dva su osnovna mehanizma razgradnje polimernih uzoraka, površinska razgradnja te razgradnja u masi materijala. Karakteristika razgradnje u masi materijala je znatna promjena molekulskih masa polimernih molekula prije nego se znatno promijeni masa uzorka. Masa uzorka znatno se mijenja tek kad niskomolekularni produkti razgradnje postanu topljivi u mediju za razgradnju. Karakteristika površinske razgradnje, erozijom jest znatna promjena mase uzoraka, dok se molekulska mase ne mijenja.

Molekulska masa PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon enzimske razgradnje određena je metodom kromatografije na propusnom gelu (GPC) s toluenom kao mobilnom fazom, eluensom. Rezultati određivanja molekulskih masa prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Vrijednosti brojčanog prosjeka molekulskih masa PCL polimera i PCL/GEL mješavina te vrijednosti indeksa polidisperznosti (PD) prije i tijekom 4 tjedna razgradnje u PBS otopini enzima

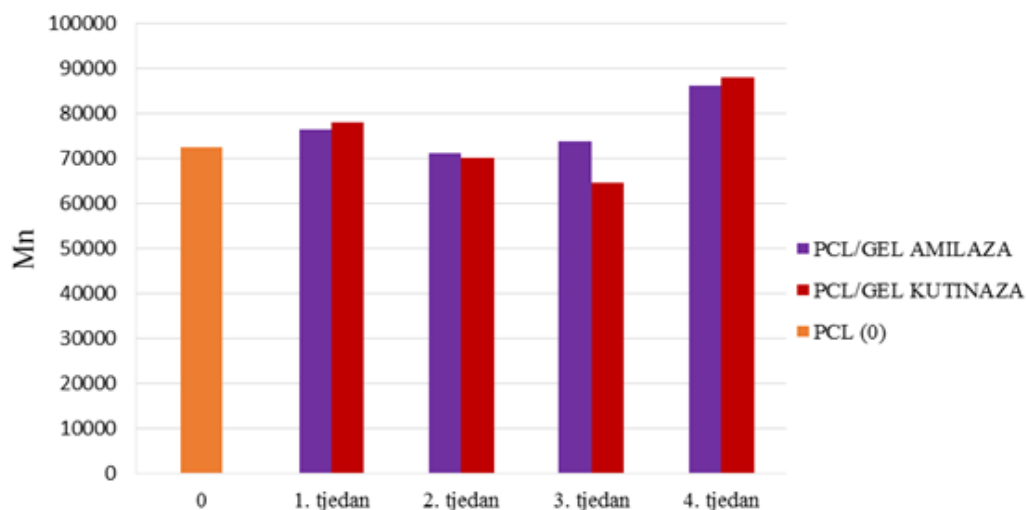
Enzim	uzorak	vrijeme		
		razgradnje (sati)	Mn	PD
-	PCL	0	72575	1,76
$\alpha$ -amilaza	PCL	168	74921	1,68
	PCL	336	69560	1,95
	PCL	504	78602	1,70
	PCL	672	83854	1,76
	PCL	168	72140	1,74
kutinaza	PCL	336	77587	1,83
	PCL	504	74453	1,74
	PCL	672	76942	1,51
	PCL/GEL	168	76509	1,68
$\alpha$ -amilaza	PCL/GEL	336	71234	1,76
	PCL/GEL	504	73814	1,77
	PCL/GEL	672	86204	1,59
	PCL/GEL	168	78200	1,69
kutinaza	PCL/GEL	336	70269	1,76
	PCL/GEL	504	64593	1,63
	PCL/GEL	672	88088	1,46





**Slika 33.** Vrijednosti brojčanog prosjeka molekulskih masa PCL polimera prije i tijekom 4 tjedna razgradnje u PBS otopini enzima

Vrijednosti brojčanog prosjeka molekulskih masa PCL polimera nakon razgradnje u PBS otopini amilaze ne mijenjaju se bitno u odnosu na početnu vrijednost brojčanog prosjeka molekulskih masa PCL polimera prije razgradnje. Kod uzoraka PCL polimera nakon razgradnje u PBS otopini kutinaze zabilježen je gubitak mase od oko 26 %, a iz slike 33. je vidljivo da se vrijednost brojčanog prosjeka molekulskih masa uzoraka neznatno promijenila.



**Slika 34.** Vrijednosti brojčanog prosjeka molekulskih masa PCL polimera u PCL/GEL mješavinama prije i tijekom 4 tjedna razgradnje u PBS otopini enzima

Kod uzoraka PCL/GEL mješavina nakon razgradnje u PBS otopini kutinaze i amilaze vidljiva je značajnija promjena mase u odnosu na uzorke PCL polimera, a brojni prosjeci molekulskih masa uzoraka također su bliske početnoj vrijednosti brojčanog prosjeka molekulskih masa PCL-

a prije razgradnje kao što je vidljivo iz slike 34. Na temelju navedenog može se zaključiti da se hidrolitička razgradnja PCL polimera i PCL/GEL mješavine u PBS otopini kutinaze i amilazeu odvija površinskim mehanizmom razgradnje.

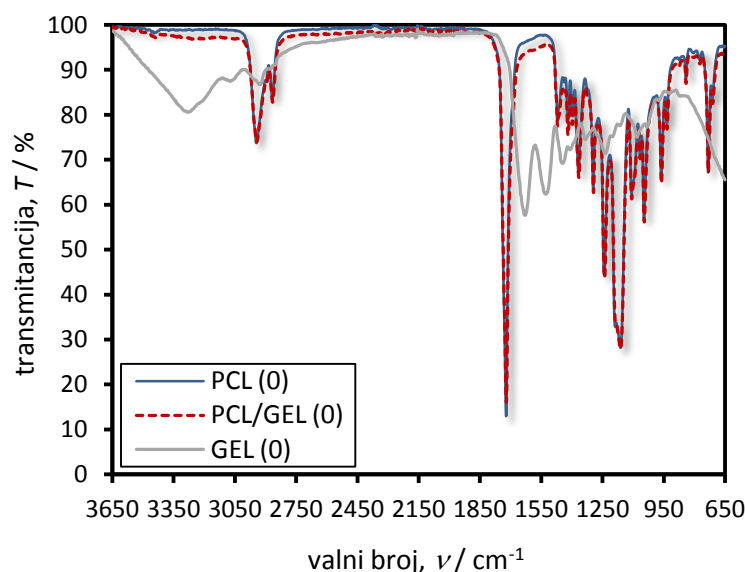
Može se očekivati da će se uočene promjene odraziti na površinska, toplinska i mehanička svojstva PCL polimera i PCL/GEL mješavina. Jednaka zapažanja zabilježena su u literaturi prilikom enzimske razgradnje biorazgradivih polimera.

## 5. 2. Karakterizacija površine

### 5.2.1. Rezultati FTIR-ATR spektroskopije

FTIR-ATR spektroskopijom praćene su strukturne promjene PCL polimera i PCL/GEL mješavine (90/10) tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze.

Usporedni FTIR-ATR spektri čistih komponenta PCL(0), GEL(0) – želatine i mješavine PCL/GEL(0) dobiveni prije i tijekom različitih vremena, 1. - 4. tjedna (168, 336, 504 i 672 sati) hidrolitičke razgradnje u otopinama različitih enzima prikazani su na slikama 35.– 39.



**Slika 35.** Usporedni FTIR-ATR spektri uzoraka PCL (0), GEL (0) - želatine i PCL/GEL (0) mješavine prije enzimske razgradnje

Na spektru ishodnog PCL polimera slika 35. uočavaju se karakteristične apsorpcijske vrpce dugačkih alkilnih lanaca (vibracije  $\text{CH}_2$  istezanja) u području 2950  $\text{cm}^{-1}$ , 2919  $\text{cm}^{-1}$ , 2857  $\text{cm}^{-1}$ , 1475  $\text{cm}^{-1}$  i 715  $\text{cm}^{-1}$ . [31 ]

Karbonilna skupina PCL prikazana je na slici 35. Vrpca se sastoji od dvije razdvojene vrpce koje se preklapaju. Relativno široka vrpca smještena je kod 1737  $\text{cm}^{-1}$  a oštija i intenzivnija vrpca smještena je kod 1724  $\text{cm}^{-1}$  koje se prema literaturi pripisuju amorfnim i kristalnim fazama polimera [32]. Amorfna vrpca je relativno široka zbog većeg područja u koje

se može smjestiti karbonilna skupina u amorfnoj fazi. U kristalnoj fazi ta situacija je drugačija zbog većeg stupnja središtenosti koja vodi manjem broju mogućih smještaja i zato se uočava oštiji pik. Sljedeći razlog većeg stupnja središtenosti u kristalnoj fazi jest prisutnost inter i intramolekulnih veza. Te sile utječu na dipolni moment karbonilnih skupina vezanih u kristalne lamelle i zato se te vrpce pomiču prema nižim valnim brojevima.

Na FTIR-ATR spektru PCL/GEL(0) mješavine, slika 35. ne uočavaju se dodatne apsorpcijske vrpce želatine što upućuje na zaključak da su čestice gela prekrivene PCL polimerom. Potrebno je napomenuti da dubina prodora infracrvene svjetlosti u uzorak ovisi o refrakcijskom indeksu uzorka i da se obično kreće od 0,5 do 2,0  $\mu\text{m}$ , odnosno da se ovdje izneseni rezultati odnose na spektroskopske analizu površine do dubine od 2,0  $\mu\text{m}$ .

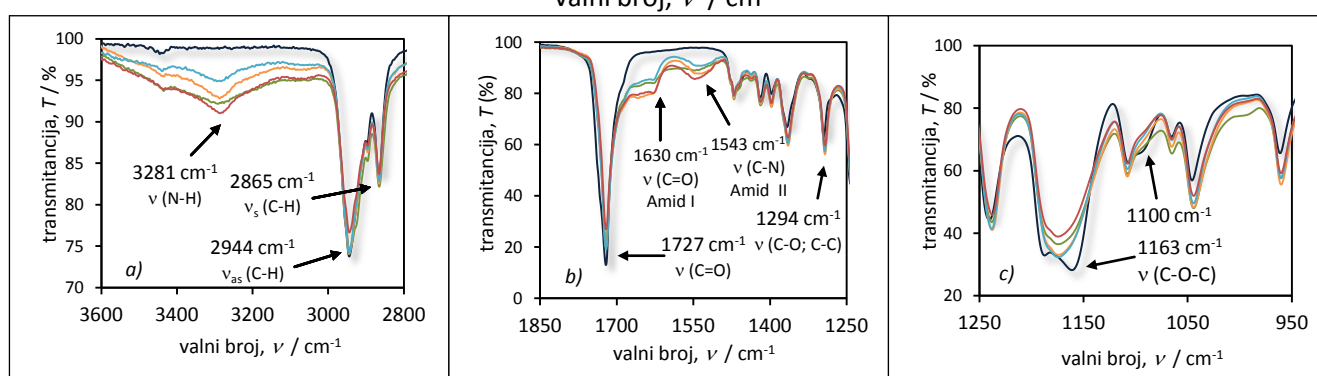
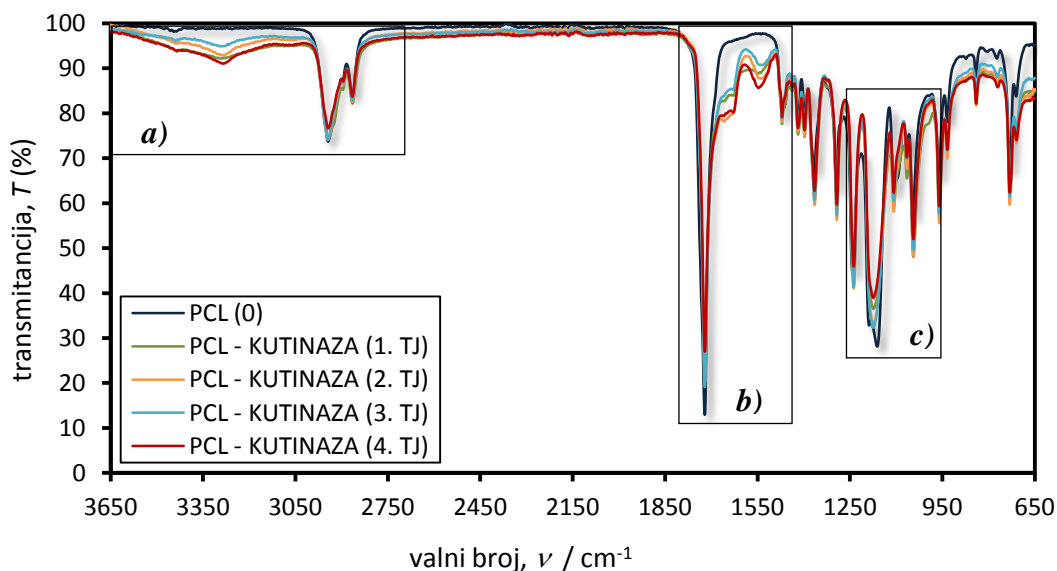
Prema literaturi FTIR-ATR spektar želatine pokazuje vibracije karbonilnog istezanja amidne skupine kod  $1650\text{ cm}^{-1}$  (amid I) i N-H savijanja te C-N istezanje amidne i amino skupine kod  $1550\text{ cm}^{-1}$  (amid II). [33]

Na slikama 36.-39. prikazani su FTIR-ATR spektri uzoraka polimera PCL-a i PCL/GEL mješavina nakon različitih vremena hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze.

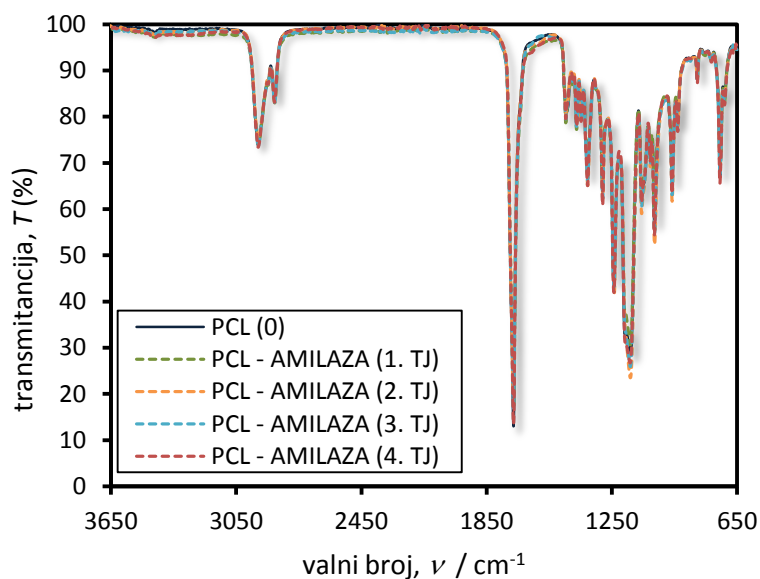
U analizi FTIR-ATR spektra područje od interesa nalazi se između  $1800$  i  $800\text{ cm}^{-1}$  gdje su smještene aktivne esterske skupine PCL-a. Na spektru su vidljive jake apsorpcijske vrpce između  $\sim 1722$  i  $\sim 1097\text{ cm}^{-1}$ , koje se pripisuju simetričnom istezanju C=O i C-O skupina esterske veze.

Hidroliza može rezultirati stvaranjem vodikove veze ili može dovesti do pomaka esterske vrpce prema nižim frekvencijama radi nukleofilog napada molekulama vode. Rezultati pokazuju da se karbonilna skupina C=O koja se pripisuje esterskoj vezi ne pomiče, ali se sužava. To se može pripisati porastu udjela kristalne i smanjenju udjela amorfne faze polimera uvjetovane razgradnjom. Na toj vrpici vidljivo je izvjesno sniženje intenzivnosti s porastom vremena hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze. Ta promjena se može pripisati vibracijama istezanja koje su posljedica hidrolize polimernih lanaca.

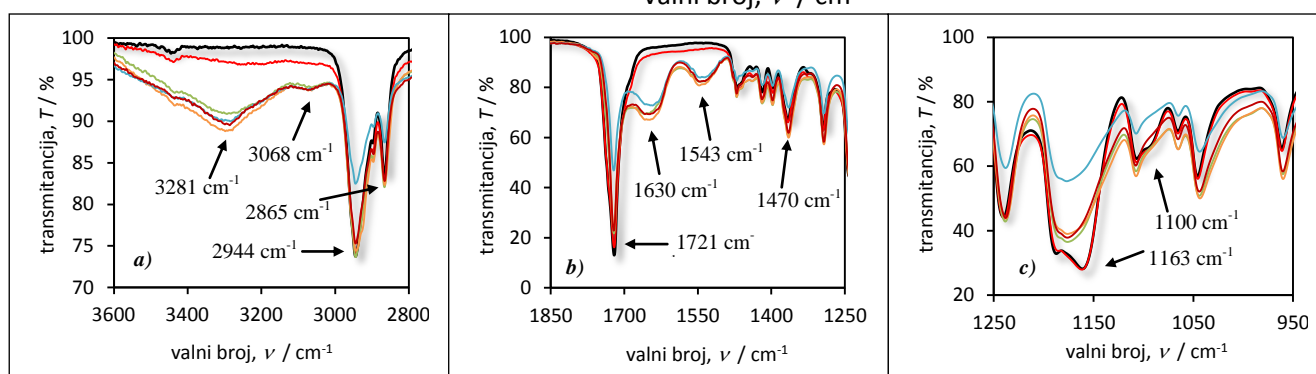
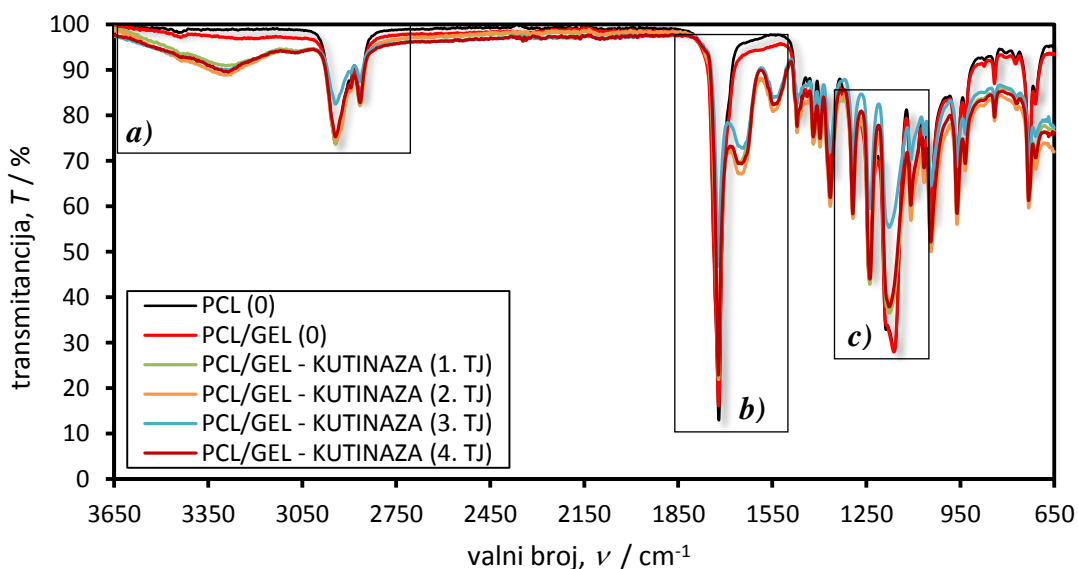
Daljnje promjene u strukturi PCL-a zbog hidrolize i apsorpcije vode uočavaju se kod vrpce u području  $1451$ - $1454\text{ cm}^{-1}$ ,  $1381$ - $1383\text{ cm}^{-1}$ ,  $1264$ - $1267\text{ cm}^{-1}$ ,  $1180$ - $1181\text{ cm}^{-1}$ ,  $1127$ - $1129\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080$ - $1083\text{ cm}^{-1}$ ,  $955$ - $956\text{ cm}^{-1}$ ,  $921\text{ cm}^{-1}$ . Sličan trend povezan s tom skupinom može se uočiti kod  $\sim 1264\text{ cm}^{-1}$ .



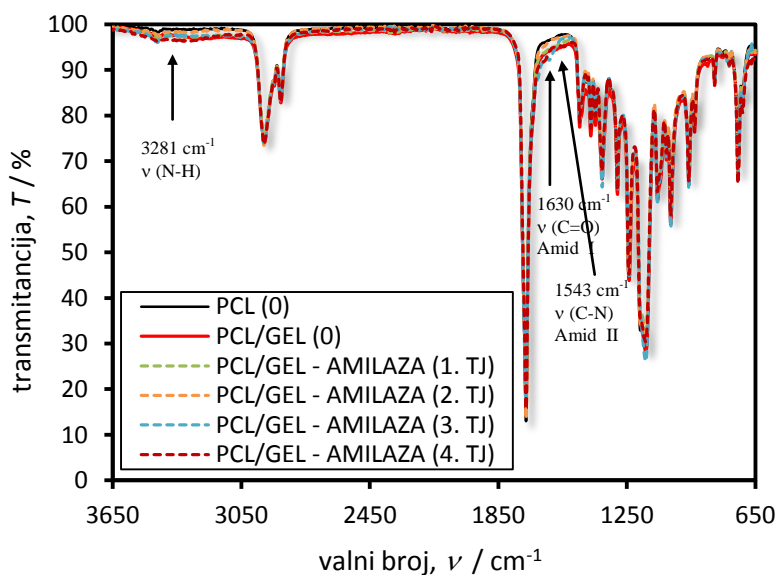
**Slika 36.** FTIR-ATR spektri PCL-a nakon različitih vremena (1. - 4. tjedna) hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze područje a) 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$ , b) područje 1850-1250  $\text{cm}^{-1}$  i c) područje 1250-950  $\text{cm}^{-1}$



**Slika 37.** FTIR-ATR spektri PCL-a nakon različitih vremena (1. - 4. tjedna) hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima  $\alpha$ -amilaze



**Slika 38.** FTIR-ATR spektri PCL/GEL mješavina nakon različitih vremena (1. - 4. tjedna) hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze područje a) 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$ , b) područje 1850-1250  $\text{cm}^{-1}$  i c) područje 1250-950  $\text{cm}^{-1}$



**Slika 39.** FTIR-ATR spektri PCL/GEL mješavina nakon različitih vremena (1. - 4. tjedna) hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima  $\alpha$ -amilaze

Na spektru PCL polimera prije hidrolitičke razgradnje u otopini enzima, slika 35. vidljive su apsorpcijske vrpce kod 1269 i 1215-1186  $\text{cm}^{-1}$ , koje su prema literaturi [34] poznate kao vrpce kristalita u PCL strukturi. One se sastoje od vibracijskih komponenata tj. C-COO istezanja, O-CH istezanja,  $\text{CH}_3$  i CH savijanja. [34] Na spektru PCL (0), slika 36. vidljive su vrpce između 1240 i 1200  $\text{cm}^{-1}$  koje se pripisuju kristalnoj strukturi PCL-a. Mali pomak ovih vrpce može se očekivati ovisno o načinu pripreme uzorka, molekularnoj masi i drugim čimbenicima [34]. Odsutnost vrpce kristalita u niskomolekulnim uzorcima između 1215 i 1186  $\text{cm}^{-1}$  odgovara odsutnosti kristalnosti PCL-a.

Na spektru PCL polimera nakon 672 sata (4. tjedna) hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze vidljiva je promjena u području dvije vrpce (rame) kod 2957  $\text{cm}^{-1}$  i 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Na spektrima uzoraka PCL i PCL/GEL mješavina tijekom razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze vidljiva je pojava novih vrpce u području 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  koje se mogu pripisati proteinima prisutnim na površini, slika 36. i 38. Vrpce koje se javljaju kod  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  pripisuju se amidu I a vrpca kod  $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$  amidu II [35], što ukazuje na mogućnost da se na površinu PCL-a tijekom izlaganja enzimskoj razgradnji enzim kutinaze adsorbirao na površinu PCL polimera, odnosno PCL/GEL mješavine. Intenzivnost vrpce raste s porastom vremena razgradnje, osobito kod uzoraka PCL/GEL mješavine.

Tijekom 672 sata hidrolitičke razgradnje kod PCL-a vrpce u potpunosti nestaju, kako kod polimera PCL tako i kod mješavina PCL/GEL, slike 36. i 38. Ove promjene ukazuju na izvjesne promjene uvjetovane promjenama u strukturi polikaprolaktona hidrolitičkom razgradnjom. Nadalje, vidljivo je da se smanjuje intenzivnost vrpce kod 1721  $\text{cm}^{-1}$  te da se intenzivnost vrpce kod 1653  $\text{cm}^{-1}$  i 1542  $\text{cm}^{-1}$  povećava s vremenom hidrolitičke razgradnje PCL-a, osobito PCL/GEL mješavina.

Hidrolitička razgradnja poliestera uključuje reakcije cijepanja lanaca na esterskim vezama. Tijekom tog procesa svaka molekula vode "napada" jednu estersku skupinu [32]. FTIR-ATR spektroskopijom su utvrđene značajne promjene u strukturi PCL i PCL/GEL mješavina s porastom vremena hidrolitičkog starenja u PBS otopini enzima kutinaze dok  $\alpha$ -amilaza, ne utječe značajno na razgradnju PCL i PCL/GEL mješavine.

### **5.2.2. Slobodna površinska energija i parametri adhezije PCL/GEL mješavine**

Jakost interakcija, odnosno adhezija na međupovršini dviju faza, značajno utječe na svojstva polimerne mješavine. Jedan od načina procjene adhezije na međupovršini polimer/polimer jest proračun parametara adhezije binarnih sustava: termodinamičkog rada adhezije ( $W_{12}$ ), slobodne međupovršinske energije ( $\gamma_{12}$ ) i koeficijenta razlijevanja ( $S_{12}$ ). Prisutnost interakcija na međupovršini dvaju polimera, iako važan, samo je jedan od čimbenika koji utječu na svojstva višefaznih sustava. Prilikom razmatranja višefaznih sustava od izuzetne

važnosti su i veličina površine kontakta, jednolikost raspodjele čestica dispergirane faze, i morfologija mješavine.

### 5.2.3 Mjerenja kontaktnog kuta različitim testnim kapljevina

Slobodna površinska energija PCL polimera i želatine, GEL dobivena je metodom mjerenja kontaktnog kuta. U tablici 5. prikazane su vrijednosti kontaktnih kutova čistih komponenata PCL i želatine, a u tablici 6. dobivene vrijednosti disperzijskih i polarnih komponenata, te ukupne slobodne površinske energije. Za proračun slobodne površinske energije korišteni su Owens-Wendtov model, model geometrijske sredine i Wuov model, model harmonijske sredine [36].

Za mjerenja kontaktnog kuta na površini PCL-a i želatine kao testne kapljevine korišteni su diiodometan i glicerol. Na temelju eksperimentalnih vrijednosti kontaktnog kuta s navedenim testnim kapljevina proračunata je vrijednost slobodne površinske energije PCL-a i želatine.

**Tablica 5.** Vrijednosti kontaktnog kuta za PCL i želatinu GEL mjerene s testnim kapljevina diiodometan i glicerol

uzorak	kontaktni kut / °	
	dijodometan	glicerol
<b>PCL</b>	47,97	76,58
<b>GEL</b>	35,86	61,75

Vrijednosti kontaktnog kuta želatine niže su od vrijednosti kontaktnog kuta PCL-a što ukazuje na znatnije međudjelovanje na međupovršini s testnim kapljevina. Viša vrijednost kontaktnog kuta glicerola na površini PCL-a ukazuje na slabe polarne interakcije, dok su polarne interakcije izraženije kod želatine te je kontaktni kut manji, tablica 5.

**Tablica 6.** Vrijednosti disperzijske ( $\gamma^d$ ), polarne ( $\gamma^p$ ) komponente i ukupne ( $\gamma$ ) slobodne površinske energije PCL i želatine

uzorak	Slobodna površinska energija					
	Owens-Wendt			Wu		
	$\gamma^d$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma^p$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma^d$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma^p$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$\gamma$ (mJ m <sup>-2</sup> )
<b>PCL</b>	35,40	0,31	35,41	36,39	1,24	37,63
<b>želatina</b>	41,63	2,11	43,74	42,00	4,28	46,28

Vrijednosti slobodne površinske energije dobivene primjenom Wu-ova modela više su od vrijednosti slobodne površinske energije dobivene primjenom Owens – Wendt-ova modela,

tablice 5. Vrijednosti ukupne slobodne površinske energije su niske što je karakteristično za polimere. Vrijednost polarne komponente slobodne površinske energije PCL-a vrlo je mala, a što je posljedica kemijske strukture to jest prisutnosti nepolarnih skupina u lancu polimerne molekule. Kod želatine u peptidnom lancu prisutne su aminokiseline s polarnim skupinama te je vrijednost polarne komponente slobodne površinske energije veća u odnosu na polarnu komponentu slobodne površinske energije PCL-a.

Poznavanje termodinamičkih parametara adhezije omogućava procjenu međudjelovanja na međupovršini. Proračun termodinamičkih parametara adhezije temelji se na poznavanju slobodne energije površine komponenata sustava. Termodinamički parametri adhezije su slobodna energija međupovršine, koeficijent razlijevanja te termodinamički rad adhezije.

Parametri adhezije mješavine PCL/GEL izračunati su iz slobodne površinske energije pojedine komponente prema modelu Owens – Wendt-a i Wu-a, a rezultati su prikazani u tablici 6. Za postizanje optimalne adhezije na međupovršini treba biti zadovoljen uvjet minimalne slobodne međupovršinske energije, maksimalnog termodinamičkog rada adhezije te vrijednost koeficijenta razlijevanja veća od nula. Adhezija u mješavini PCL/GEL ovisi o interakcijama između komponenata mješavine. Što je veća adhezija između komponenata manja je slobodna energija međupovršine. Vrijednost slobodne međupovršinske energije mješavine PCL/želatina te vrijednost koeficijenta razlijevanja S, koji je veći od nula, ukazuje na znatne interakcije na međupovršini PCL/GEL.

**Tablica 7.** Vrijednosti parametara adhezije: međupovršinska slobodna energija  $\gamma_{sl}$ , koeficijent razlijevanja S i termodinamički rad adhezije  $W_a$  mješavine PCL/želatina

Uzorak	Owens-Wendt			Wu		
	$\gamma_{sl}$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$W_a$ (mJ m <sup>-2</sup> )	S	$\gamma_{sl}$ (mJ m <sup>-2</sup> )	$W_a$ (mJ m <sup>-2</sup> )	S
<b>PCL/želatina</b>	1,01	78,1	7,36	1,5	82,25	7,31

#### 5.2.4 Kontaktni kut s vodom (hidrofilnost)

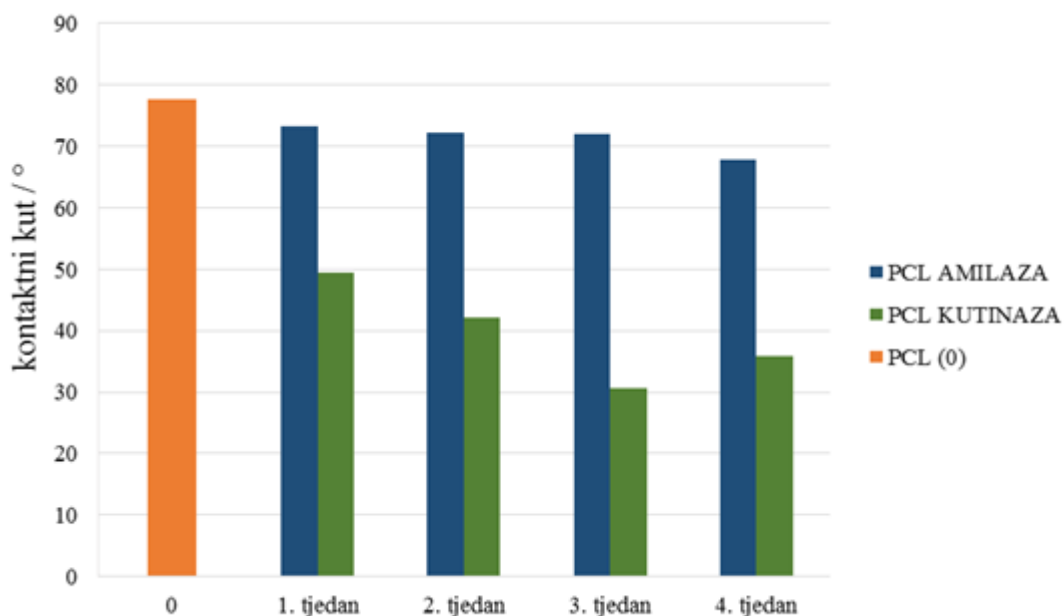
Primjenom tehnike mjerenja kontaktnog kuta određenu su karakteristike površine PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon razgradnje u PBS otopinama s enzimima kutinaze i amilaze. Kontaktni kut mjeren je s kapljevina poznate slobodne površinske energije. Promjena hidrofilnosti površine PCL polimera i mješavine PCL/GEL prije te nakon enzimske razgradnje praćena je mjerenjem kontaktnog kuta s vodom kao testnom kapljevina. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom na površini PCL-a te mješavine PCL/želatina prije te nakon enzimske razgradnje prikazani su u tablici 8.



**Tablica 8.** Rezultati mjerenja kontaktnog kuta PCL polimera i PCL/GEL mješavine s vodom kao testnom kapljevinom prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje s kutinazom

Enzim	Uzorak	vrijeme razgradnje (sati)	Kontaktni kut / °
-	PCL	0	77,67 ± 2,27
-	PCL /GEL	0	60,16 ± 0,72
<b>α-amilaza</b>	PCL	168	73,25 ± 3,32
	PCL	336	72,25 ± 5,04
	PCL	504	72,02 ± 2,67
	PCL	672	67,90 ± 2,13
<b>kutinaza</b>	PCL	168	49,46 ± 1,65
	PCL	336	42,15 ± 1,13
	PCL	504	30,74 ± 2,57
	PCL	672	35,89 ± 1,57
<b>α-amilaza</b>	PCL /GEL	168	47,92 ± 4,71
	PCL /GEL	336	46,29 ± 5,49
	PCL /GEL	504	42,33 ± 5,17
	PCL /GEL	672	40,61 ± 4,11
<b>kutinaza</b>	PCL /GEL	168	76,79 ± 0,68
	PCL /GEL	336	66,84 ± 0,00
	PCL /GEL	504	51,25 ± 4,18
	PCL /GEL	672	54,61 ± 0,00

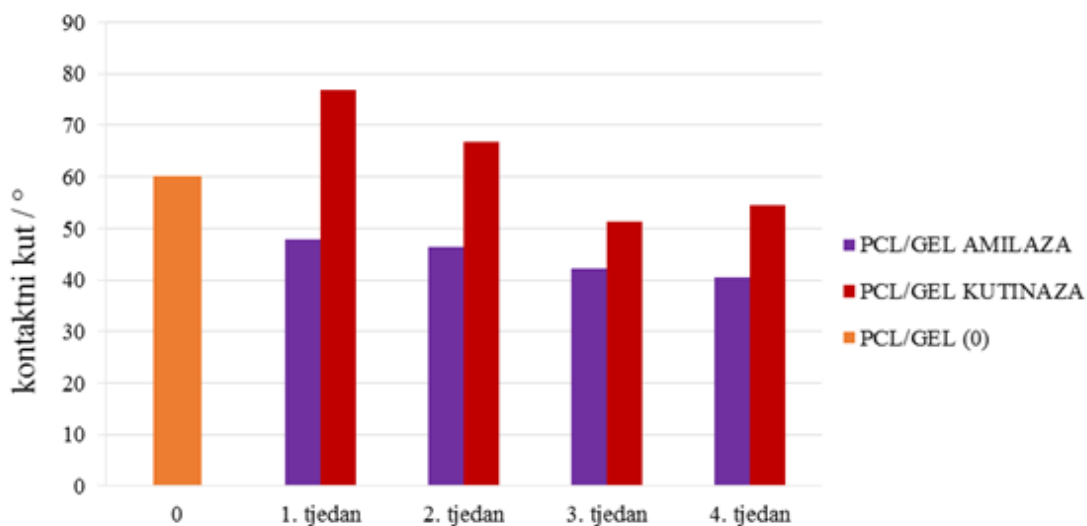
Vrijednost kontaktnog kuta s vodom na površini PCL polimera prije razgradnje iznosi 76,67 ° što ukazuje hidrofobnost površine PCL-a. Hidrofobnost PCL-a posljedica je kemijske strukture monomerne jedinice polimerne molekule koja sadrži pet hidrofobnih –CH<sub>2</sub> skupina. Hidrofobnost PCL-a smanjena je umješavanjem hidrofilne želatine što je vidljivo iz kontaktnog kuta mješavine PCL/želatina (PCL/GEL), tablica 8.



**Slika 40.** Vrijednosti kontaktnog kuta PCL-a prije i tijekom 4 tjedna (168 – 672 sata) enzimske razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze

Vrijednosti kontaktnog kuta PCL polimera nakon razgradnje s  $\alpha$ -amilazom smanjuju se s duljim vremenom enzimske razgradnje. Hidrofilnost uzoraka se neznatno promijenila što je vidljivo iz vrijednosti kontaktnog kuta, slika 40. Analizom površine infracrvenom spektroskopijom (ATR) na površini uzoraka PCL-a nije utvrđeno nastajanje –OH skupina, ali je utvrđena prisutnost amino skupine ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ). Površina uzorka se nakon 672 sata enzimske razgradnje nije bitno promijenila u odnosu na površinu PCL polimera prije razgradnje, što je moguće utvrditi SEM analizom površine. Na temelju navedenog može se pretpostaviti da je povećanje hidrofilnosti uzoraka posljedica adsorpcija enzima na površinu s obzirom da jedino enzimi sadrže amino skupine u ispitivanom sustavu.

Hidrofilnost površine PCL polimera nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom povećava se s vremenom što je vidljivo iz smanjenja kontaktnog kuta, tablica 8. Analizom površine uzorka infracrvenom spektroskopijom (ATR) je utvrđeno da na površini uzorka nastaju –OH skupine. Prisutnost –OH skupina na površini doprinosi povećanju hidrofilnosti uzoraka. SEM analizom površine mogu se utvrditi promjene na površini nastale uslijed razgradnje amorfnе faze, što bi dodatno mogao biti razlog smanjenju kontaktnog kuta. Kod uzoraka koji su duže vrijeme stari u mediju s kutinazom smanjenje vrijednost kontaktnog kuta nakon 30 s je izraženije, slika 40. Može se pretpostaviti da je kod duljeg vremena enzimske razgradnje nastala poroznija struktura na površini.



**Slika 41.** Vrijednosti kontaktnih kutova mješavine PCL/GEL prije i tijekom 4 tjedna (168 – 672 sata) enzimske razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze

Hidrofilnost uzoraka PCL/GEL mješavine nakon razgradnje u PBS otopini s  $\alpha$ -amilazom povećavala se što je vidljivo iz smanjenja vrijednosti kontaktnog kuta, slika 41. Infracrvenom spektroskopijom (ATR) nije utvrđeno nastajanje –OH skupina na površini uzorka. Vjerojatno poroznost površine dodatno doprinosi sniženju vrijednosti kontaktnog kuta. Nastale pore na površini omogućavaju kontakt testne kapljevine sa želatinom koja se nalazi u slojevima ispod površine što utječe na smanjenje kontaktnog kuta.

Iako je infracrvenom spektroskopijom (FTIR-ATR) utvrđeno nastajanje –OH skupina na površini uzoraka PCL/GEL mješavine nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom, značajnije sniženje kontaktnih kutova uočava se kod površine PCL/GEL mješavine nakon razgradnje u PBS otopini s  $\alpha$ -amilazom. Površina uzoraka mješavine PCL/GEL nakon razgradnje s kutinazom znatno je hrapavija od površine uzorka mješavine PCL/GEL starenih u mediju s  $\alpha$ -amilazom što također može utjecati na mjerenja kontaktnog kuta.

### 5.3. Toplinska svojstva PCL i PCL/GEL mješavina

#### 5.3.1. Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije - (DSC)

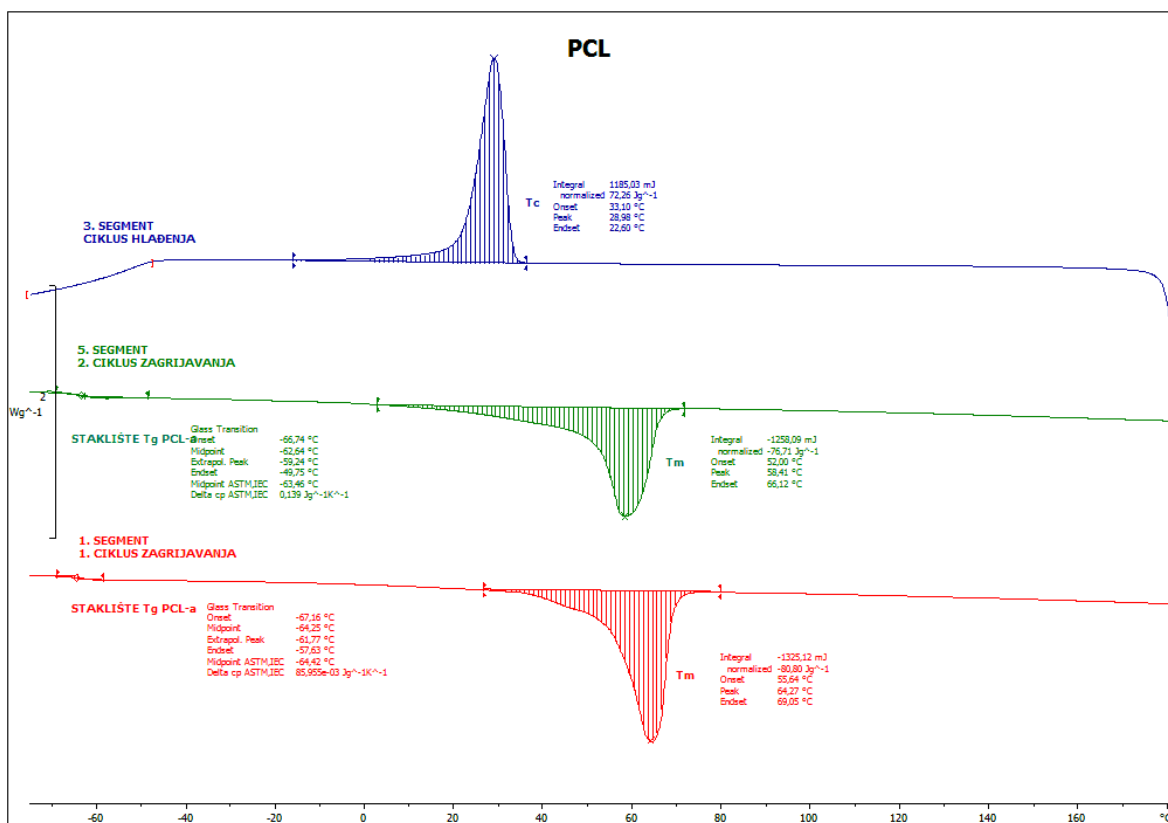
Nakon mjerenja kontaktnog kuta s vodom provedena su mjerenja diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon enzimske razgradnje. Na slikama 42. i 43. prikazani su usporedni DSC endotermni prijelazi tališta dobiveni u 1. i 2. ciklusu zagrijavanja te kristališta dobiveni u ciklusu hlađenja PCL polimera i

PCL/GEL mješavine prije hidrolitičke razgradnje. Vrijednosti staklišta  $T_g$ ; tališta,  $T_m$ ; kristališta,  $T_c$ ; i entalpije taljenja  $\Delta H_m$  i entalpije kristalizacije  $\Delta H_c$  očitane iz termograma prikazane su u tablicama 10. - 12.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kod svih uzorka postoji promjena koja je najveća nakon prvog i drugog tjedna. Čistom PCL-u prije razgradnje enzimima kristalnost je 50,71 %, dok mu je staklište -53,46 °C. Nakon prvog tjedna u kutinazi dolazi do porasta kristalnosti na 59,75%. U drugom tjednu dolazi do sniženja kristalnosti na vrijednost ispod početne odnosno 44,27%, u trećem tjednu 44,20%, četvrtom tjednu 44,54%, što nam nakon drugog tjedna pokazuje stagnaciju kristalnosti. Staklište nakon prvog tjedna u kutinazi uređaj nije mogao odrediti, a drugi tjedan je on -64,99 °C, treći tjedan -65,12 °C, četvrti tjedan -65,43 °C, što je veliki pomak od nultog uzorka gdje je staklište prosječno za 11 °C više. Također, ispitivajući uzorke mješavine PCL-a i želatine dobili smo podatke da je kristalnost uzorka bez tretmana enzimima 57,81%. Nakon prvog tjedna tretmana kutinazom kristalnost raste na 65,47%, nakon drugog tjedana pada na 50,00%, te nakon trećeg i četvrtog tjedna približno stagnira s 48,90% i 51,90%. DSC uređaj nije bio u mogućnosti odrediti staklišta za nulti uzorak i uzorak nakon prvog tjedna tretiranog kutinazom. Mješavina PCL/GEL nakon razgradnje kutinazom nakon 2. tjedna ima staklište na -64,95 °C, nakon trećeg tjedna - 64,40 °C, te nakon četvrtog -64,46 °C, iz čega vidimo da su približno jednaka.

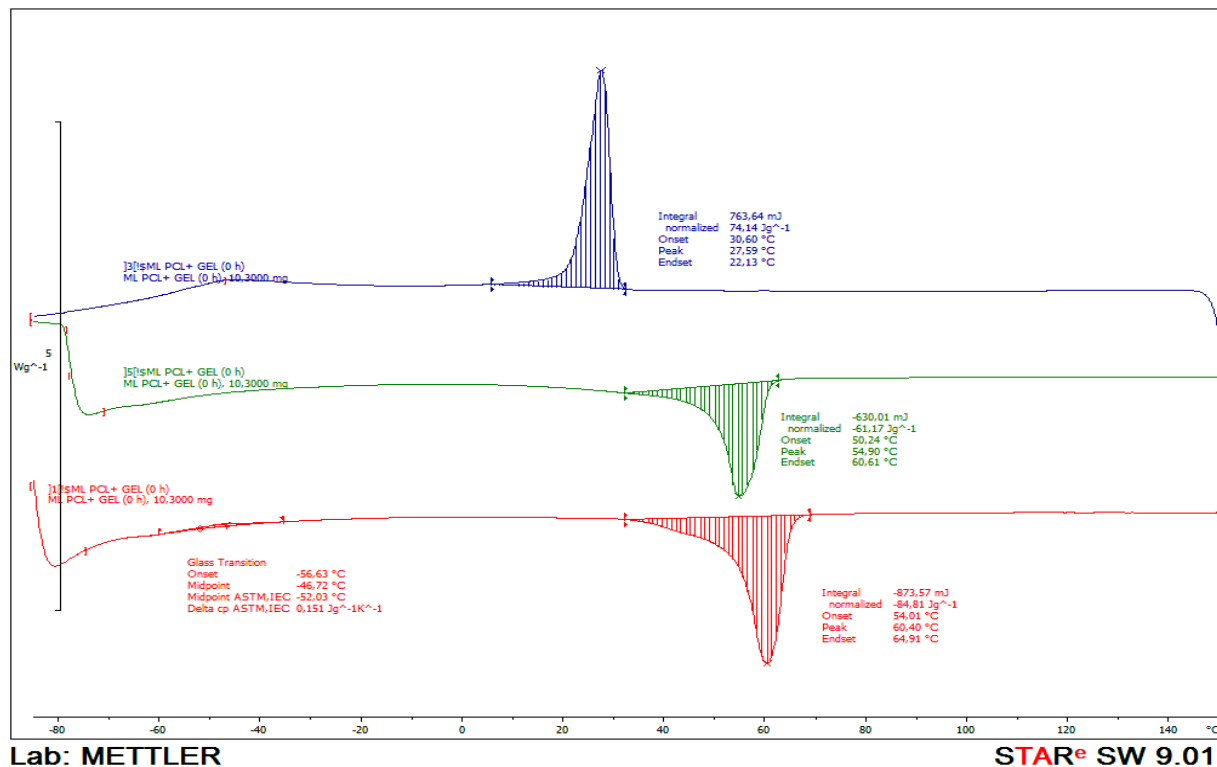
Kod čistog PCL-a tretiranog amilazom dolazi do sličnih promjena, nakon 1. tjedna kristalnost raste na 57,24%, nakon 2. tjedna pada ispod razine nultog uzorka na 41,83%, te nadalje stagnira nakon trećeg tjedna na 43,15% i četvrtog tjedna 43,05%. Staklište u amilazi, slično kutinazi, značajno se snižava nakon 2. tjedna na -64,29 °C, 3. tjedna na -64,84 °C, te četvrtog na -65,03 °C. Tretmanom u amilazi nakon prvog tjedna dobivamo mali porast kristalnosti na 59,10%, te nakon drugog tjedna pad na 42,29%, nakon trećeg tjedna kristalnost je 46,39%, te nakon četvrtog 44,95%. Staklište nakon prvog tjedna je -48,11 °C nakon drugog tjedna je -64,29°C, nakon trećeg tjedna -64,84°C, a nakon četvrtog -65,03°C što pokazuje veliki pad staklišta nakon drugog tjedna, te stagnaciju staklišta u ostalim tjednima. Iz prethodno navedenih rezultata vidi se da kristalnost ima isti trend kod PCL polimera i mješavine PCL/GEL, tretiranih u kutinazi i amilazi, gdje nakon prvog tjedna dolazi do porasta kristalnosti u odnosu na nulti uzorak, te nakon drugog tjedna pad kristalnosti koja dalje stagnira, odnosno vrijednosti su joj približno iste. Razliku kristalnosti od 5 – 15% više kod mješavine PCL/GEL tretiranih kutinazom u odnosu na čisti PCL tretiran kutinazom možemo objasniti pretpostavkom da želatina djeluje kao centar nukleacije te poboljšava rast kristala, iako se to ne pokazuje kod uzoraka tretiranih amilazom.

^exo



Slika 42. DSC termogrami 1. i 2. ciklusa zagrijavanja i ciklusa hlađenja PCL homopolimera prije razgradnje

^exo



Slika 43. DSC termogrami 1. i 2. ciklusa zagrijavanja i ciklusa hlađenja PCL/GEL mješavine prije razgradnje

**Tablica 9.** Rezultati DSC mjerenja ciklusa hlađenja PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon različitih vremena tretmana

Enzim	Uzorak	vrijeme razgradnje (sati)	DSC 3. segment (ciklus hlađenja)		
			$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$X_c$ %
Kutinaza	PCL	0	28,98	72,26	50,71
	PCL/GEL	0	27,59	74,14	57,81
	PCL	168	21,26	85,15	59,75
	PCL	336	23,07	63,08	44,27
	PCL	504	23,26	62,98	44,20
	PCL	672	23,07	63,47	44,54
	PCL/GEL	168	27,77	83,96	65,47
	PCL/GEL	336	28,4	64,13	50,00
	PCL/GEL	504	28,58	62,72	48,90
	PCL/GEL	672	28,41	66,56	51,90

**Tablica 10.** Rezultati DSC mjerenja ciklusa hlađenja PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon različitih vremena tretmana

Enzim	Uzorak	vrijeme razgradnje (sati)	DSC 3. segment (ciklus hlađenja)		
			$T_c$ (°C)	$\Delta \square_c$ $\square J \square g \square$	$X_c$ %
$\alpha$ -amilaza	PCL	168	20,42	81,57	57,24
	PCL	336	21,4	59,61	41,83
	PCL	504	22,07	61,49	43,15
	PCL	672	21,07	61,35	43,05
	PCL /GEL	168	26,6	75,8	59,10
	PCL /GEL	336	28,58	54,24	42,29
	PCL /GEL	504	27,57	59,5	46,39
	PCL /GEL	672	26,42	57,65	44,95

**Tablica 11.** Rezultati DSC mjerenja ciklusa zagrijavanja PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje s kutinazom

Enzim	Uzorak	vrijeme razgradnje (sati)	DSC 5. segment (2 ciklus zagrijavanja)			
			T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
Kutinaza	PCL	0	-53,46	58,41	76,71	53,83
	PCL/GEL	0	-	54,9	61,17	47,70
	PCL	168	-	55,4	82,66	58,01
	PCL	336	-64,99	55,72	70,82	49,70
	PCL	504	-65,12	55,75	76,86	53,94
	PCL	672	-65,43	55,71	69,55	48,81
	PCL/GEL	168		57,42	78,63	61,31
	PCL/GEL	336	-64,95	58,55	64,31	50,14
	PCL/GEL	504	-64,4	58,4	72,37	56,43
	PCL/GEL	672	-64,46	59,56	74,1	57,78

**Tablica 12.** Rezultati DSC mjerenja ciklusa zagrijavanja PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje s α-amilazom

Enzim	Uzorak	vrijeme razgradnje (sati)	DSC 5. segment (2 ciklus zagrijavanja)			
			T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
α-amilaza	PCL	168	-	54,9	75,28	52,83
	PCL	336	-64,87	55,54	67,15	47,12
	PCL	504	-65,04	55,55	61,55	43,19
	PCL	672	-64,81	55,55	69,67	48,89
	PCL /GEL	168		54,08	73,97	57,68
	PCL /GEL	336	-64,29	54,73	55,43	43,22
	PCL /GEL	504	-64,84	55,89	67,37	52,53
	PCL /GEL	672	-65,03	54,58	62,99	49,12

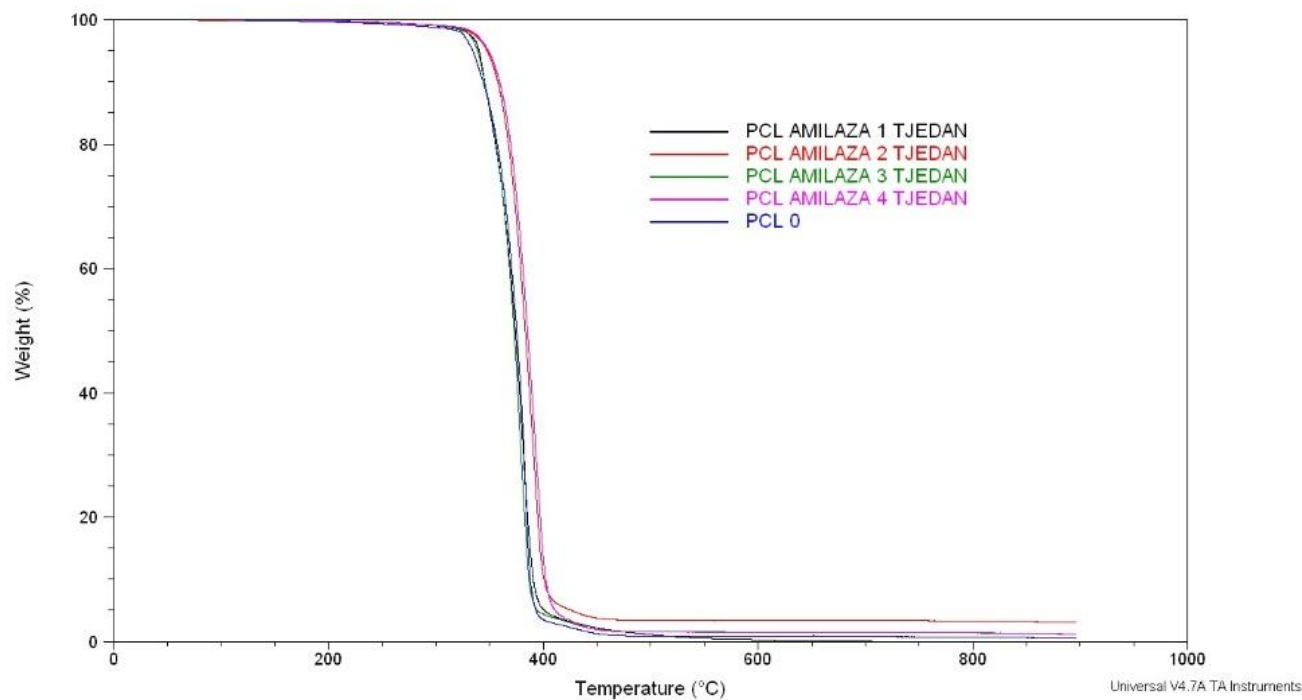
### 5.3.2 Rezultati termogravimetrijske analize

Toplinska stabilnost PCL polimera i PCL/GEL mješavina prije i tijekom različitih 4. tjedna razgradnje istražena je termogravijskom analizom.

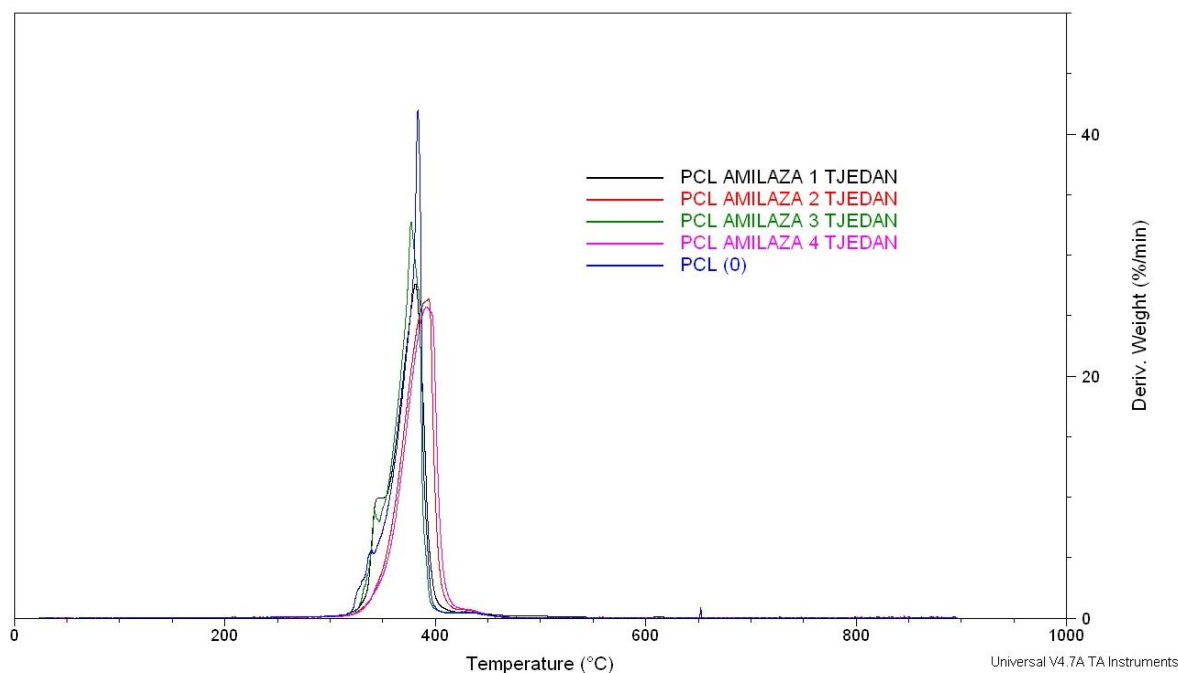
**Tablica 13.** Vrijednosti temperatura početka razgradnje ( $T_{\text{onset}}$ ), temperatura kraja razgradnje ( $T_{\text{end}}$ ), temperatura maksimalne brzine razgradnje ( $T_{\text{max}}$ ), temperatura kod 5% gubitka mase i ostatak za uzorke PCL-a i mješavine PCL/GEL prije razgradnje i uzoraka PCL-a i mješavine PCL/GEL nakon razgradnje

Enzim	Vrijeme razgradnje / sati	Uzorak	Temperatura kod 5% gubitka mase / °C	$T_{\text{onset}}$ / °C	$T_{\text{max}}$ / °C	$T_{\text{end}}$ / °C	Ostatak / %
	0	PCL-0	334,42	329,48	383,59	392,93	0,5327
	0	PCL + GEL	284,82	263,56	322,99	336,2	2,092
$\alpha$ -amilaza	168	PCL	340,26	338	381,18	394,48	0,1629
	336	PCL	347,71	338,32	393,84	400,57	3,089
	504	PCL	338,87	335,95	376,91	388,28	1,178
	672	PCL	348,94	330,23	392,03	405,39	1,183
kutinaza	168	PCL	338,37	339,41	379,34	390,02	0,2523
	336	PCL	344,23	329,16	389,37	400,33	0,3618
	504	PCL	329,71	318,55	377,48	387,81	0,5692
	672	PCL	333,87	334,79	382,03	390,67	1,251
$\alpha$ -amilaza	168	PCL /GEL	324,66	334,15	380,73	393,19	2,187
	336	PCL /GEL	331,65	277,12	389,28	399,02	0,3462
	504	PCL /GEL	323,35	321,96	370,43	386,18	0,6806
	672	PCL /GEL	328,09	325,76	383,4	396,86	1,535
kutinaza	168	PCL /GEL	336,97	333,97	390,71	398,18	1,59
	336	PCL /GEL	328,1	328,24	379,77	395,67	1,486
	504	PCL /GEL	330,15	327,96	382,43	395,28	1,384
	672	PCL /GEL	332,06	313,32	389,46	396,62	0,3312





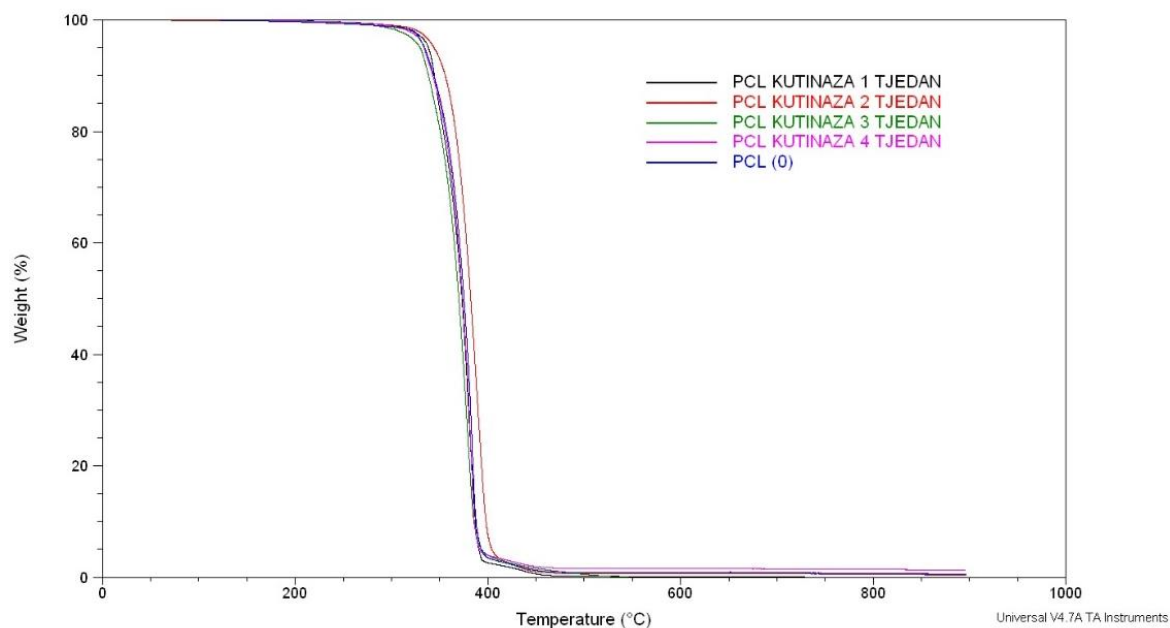
**Slika 44.** TG krivulja PCL-a prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini  $\alpha$ -amilaze



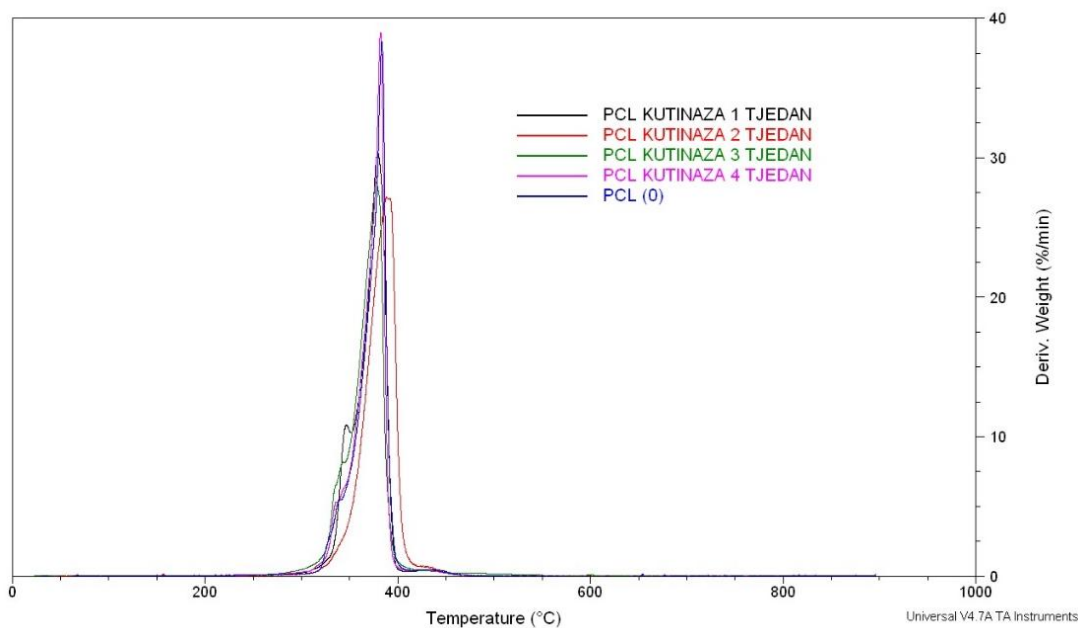
**Slika 45.** DTG krivulja PCL-a prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini  $\alpha$ -amilaze

Vrijednosti maksimalne brzine razgradnje uzoraka PCL-a starenih u PBS otopini s amilazom bliske su početnoj vrijednosti PCL polimera prije razgradnje, tablica 13. Temperatura kod 5% gubitka mase prati taj isti trend kao i temperatura početka i kraja razgradnje. Nakon enzimske razgradnje uzoraka PCL-a u PBS otopini amilaze masa uzoraka se nije bitno

promijenila kao ni molekulska masa te su prema tome toplinska svojstva ostala nepromijenjena, slika 45.

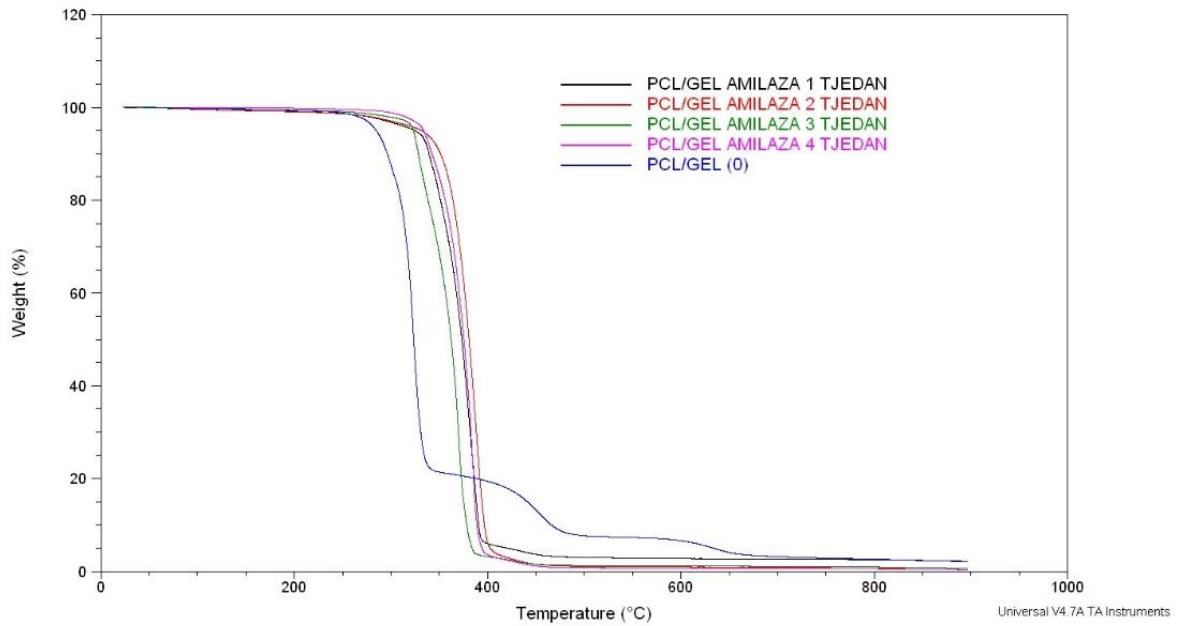


**Slika 46.** TG krivulja PCL prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini kutinaze

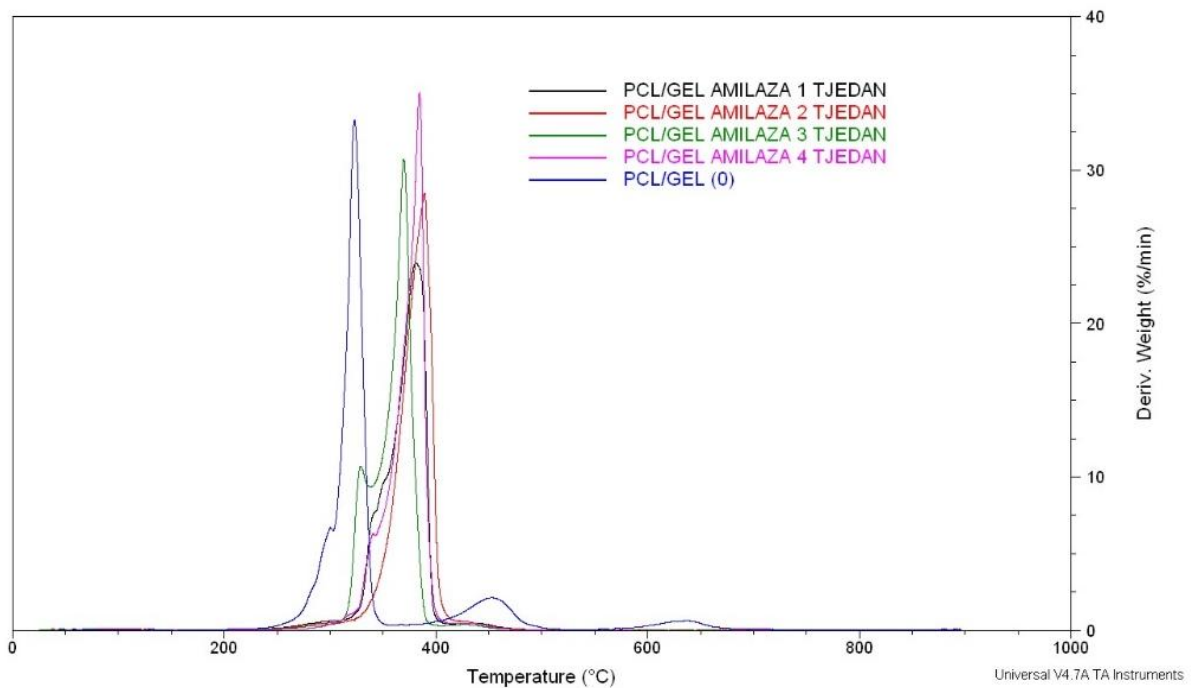


**Slika 47.** DTG krivulja PCL prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini kutinaze

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kod uzorka PCL polimera nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom nema znatnih promjena toplinske stabilnosti kao i kod uzoraka PCL-a tretiranih  $\alpha$ -amilazom, tablica 13. Kod uzoraka PCL-a promjena molekulskih masa nije uočena što je rezultiralo i nepromjenjenom toplinskom stabilnosti uzoraka nakon enzimske razgradnje.



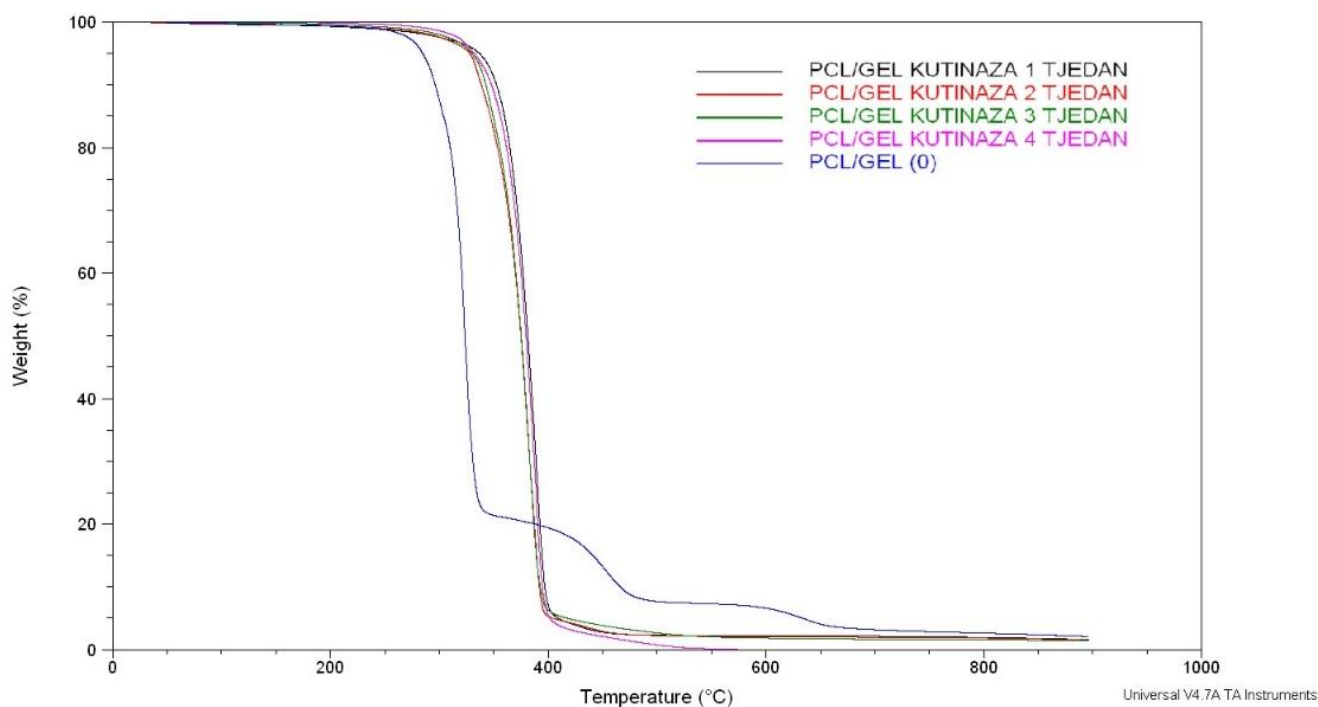
**Slika 48.** TG krivulja mješavine PCL/GEL prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini  $\alpha$ -amilaze



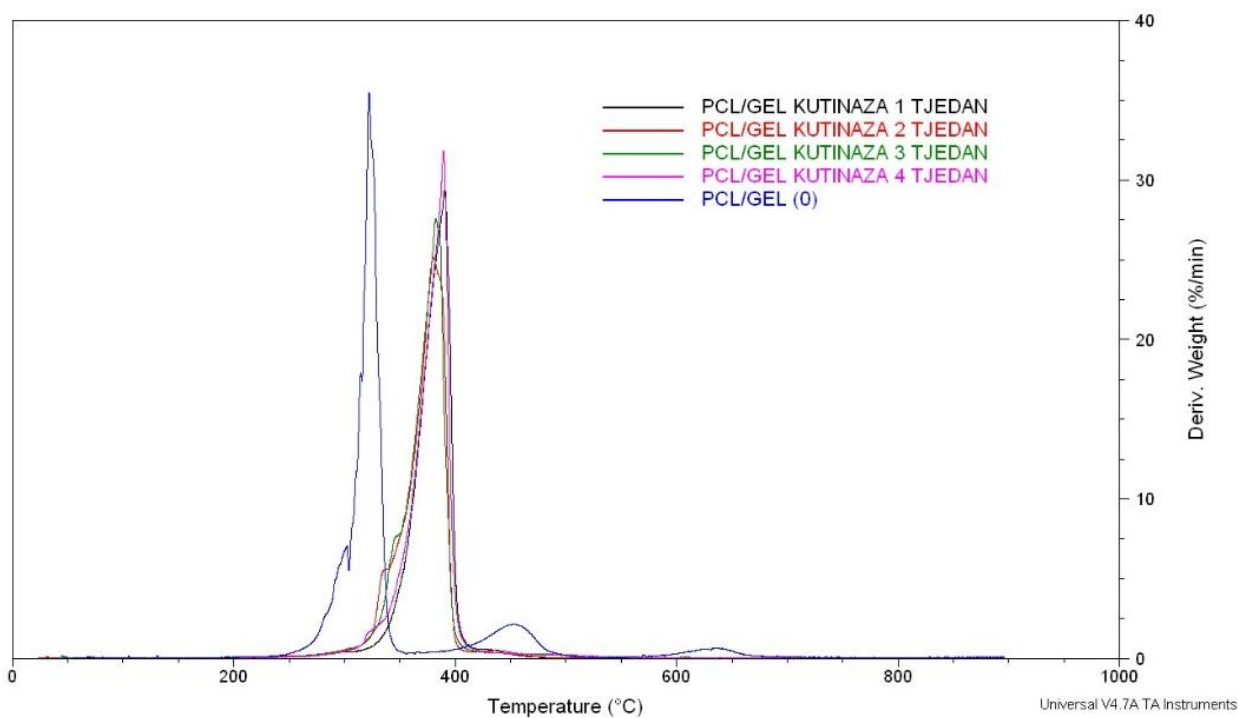
**Slika 49.** DTG krivulja mješavine PCL/GEL prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini  $\alpha$ -amilaze

Dodatkom želatine u PCL toplinska stabilnost PCL-a se smanjila što je vidljivo iz temperature početka razgradnje, tablica 13. Sniženje toplinske stabilnosti mješavine PCL/GEL prije enzimske razgradnje posljedica je manje toplinske stabilnosti želatine u odnosu na PCL. Toplinska stabilnost uzoraka PCL-a nakon razgradnje u PBS otopini  $\alpha$ -amilaze veća je od toplinske stabilnosti PCL/GEL mješavine prije enzimske razgradnje. Nakon enzimske

razgradnje dio želatine iz uzoraka nakon tretmana u otopini enzima se razgradio te se toplinska svojstva približavaju vrijednostima toplinski stabilnijeg PCL-a.



**Slika 50.** TG krivulja mješavine PCL/GEL prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini kutinaze



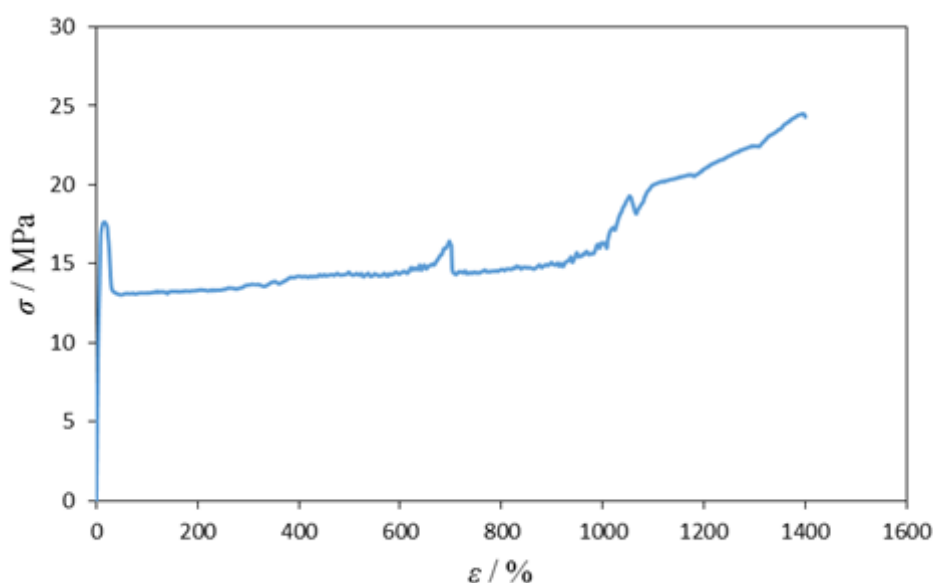
**Slika 51.** DTG krivulja mješavine PCL/GEL prije i nakon razgradnje tijekom 4. tjedna u PBS otopini kutinaze

Kod mješavine PCL/GEL tretiranih kutinazom povećava se toplinska stabilnost u odnosu na mješavinu PCL/GEL prije enzimske razgradnje, što također ukazuje na razgradnju i/ili otapanje želatine pod utjecajem kutinaze, te se toplinska stabilnost približava PCL-a polimeru prije razgradnje, tablica 13.

## 5.4. Rezultati mehaničkih svojstava

Ispitivanjem mehaničkih svojstava rastezna čvrtoća ( $\sigma$ ), prekidno istezanje ( $\epsilon$ ), rastezni modul ( $E$ ) dobiva se uvid na utjecaj enzimske razgradnje na uzorke PCL-a i mješavine PCL/želatina. Također, mehaničkim ispitivanjima istražen je utjecaj želatine na mehanička svojstva PCL-a. Mehanička svojstva mješavina općenito su uvjetovana stupnjem kristalnosti polimera, njegovom morfologijom kao i svojstvima međupovršine.

Na slici 52. prikazana je krivulja naprezanje-istezanje PCL polimera prije razgradnje. Krivulja naprezanje-istezanje čistog PCL-a odražava ponašanje viskoelastičnog materijala jasno izražene granice razvlačenja, slika 52. Nakon točke popuštanja naprezanje naglo pada, a daljnjim istezanjem uzorka naprezanje se vrlo malo mijenja dok deformacija raste. Ovo područje na krivulji naprezanje-istezanje naziva se područje hladnog tečenja. Nakon jednoličnog istezanja epruvete za nekoliko postotaka na mjestu početka popuštanja dolazi do suženja presjeka epruvete, to jest do formiranja vrata (engl. *neck*). Daljnjim istezanjem epruvete suženje putuje duž epruvete dok cijela epruveta ne prijeđe u suženje, a pri tome istezanje dostigne nekoliko stotina % od svoje izvorne duljine. Nakon područja hladnog tečenja, daljnjim istezanjem uzorka PCL-a naprezanje raste do loma uzorka (epruvete), slika 52. Iz krivulje naprezanje-istezanje uzorka PCL-a vidljivo je visoko istezanje polimera te velika žilavost, dok je naprezanje pri popuštanju nisko te se PCL može svrstati u slabe (meke) i žilave polimerne materijale.



**Slika 52.** Krivulja naprezanje-istezanje PCL polimera prije enzimske razgradnje

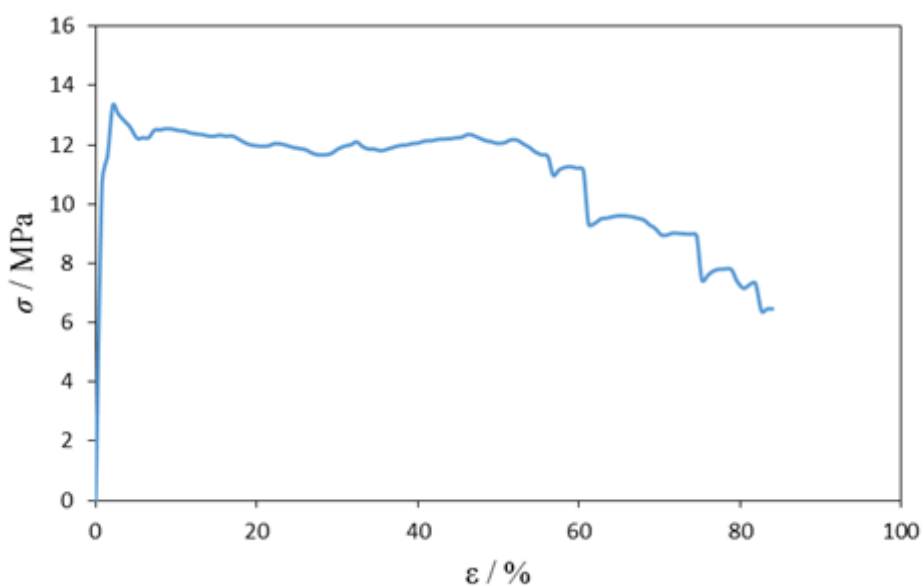
Rezultati ispitivanja mehaničkih svojstava PCL i PCL/GEL polimera prije razgradnje prikazani su u tablici 14. U tablici 14 također su prikazani rezultati mehaničkog ispitivanja uzoraka nakon enzimske razgradnje tijekom 4. tjedna.

Dodatkom želatine u PCL mehanička svojstva pripremljene mješavine znatno se razlikuju od mehaničkih svojstava čistog PCL-a ( $\sigma = 12,26 \text{ N mm}^2$ ,  $\epsilon = 11,34 \%$ ). Iz krivulje naprezanje-istezanje mješavine PCL/GEL je vidljivo da se nakon točke popuštanja formira vrat te dolazi do hladnog tečenja. Za razliku od čistog PCL-a, prilikom hladnog tečenja kod mješavine PCL/želatina istezanje epruvete je tek nekoliko postotaka od početne duljine, slika 53. Osim prekidnog istezanja ( $\epsilon$ ) dodatkom želatine u PCL smanjeno je prekidno naprezanje, dok je rastezni modul porastao, tablica 14. Prema termodinamičkim parametrima adhezije očekivana je dobra adhezija između komponenata mješavine te dobra mehanička svojstva, ali iz rezultata mehaničkih ispitivanja je vidljivo da su svojstva PCL-a bitno narušena dodatkom želatine. Mogući razlog smanjenju mehaničkih svojstva dodatkom želatine je način pripreme mješavine. Kako bi se postigla porozna struktura tijekom enzimske razgradnje komponente mješavine PCL/GEL umješavane su na temperaturi nižoj od tališta želatine kako bi se u matrici PCL-a zadržao oblik kuglica koje bi nakon bubrenja otopine u kojoj se provodi razgradnja postupno otpuštale enzime i zadržavale vodu, da se pospješiti razgradnja u njihovom okruženju a u konačnici kada se razgrade i/ili otope da preostane porozna struktura. Velike nakupine u strukturi PCL/GEL mješavine predstavljaju slaba mjesta u strukturi te se na tim mjestima inicira popuštanje prilikom naprezanja.

**Tablica 14.** Vrijednosti rastezne čvrstoće ( $\sigma$ ), prekidnog istezanja ( $\epsilon$ ), rasteznog modula ( $E$ ) za PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom i  $\alpha$ -amilazom

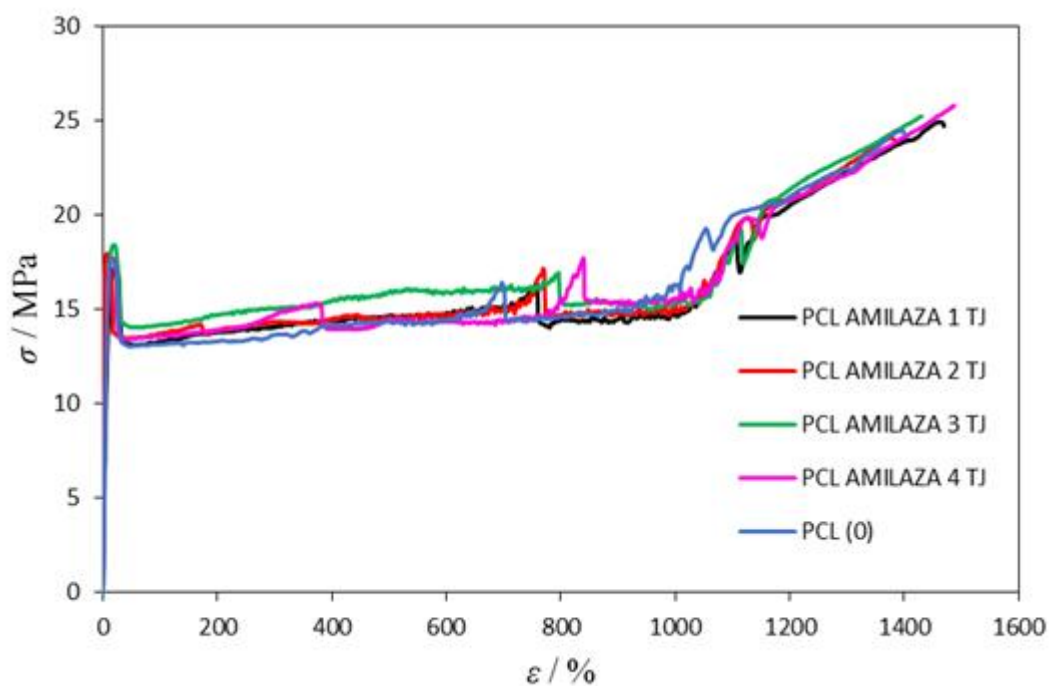
enzim	uzorak	vrijeme razgradnje / sati	$\sigma$ / MPa	$\epsilon$ / %	$E$ / MPa
-	PCL	0	24,51	1393,14	249,70
	PCL/GEL	0	12,26	11,34	303,30
$\alpha$ -amilaza	PCL	168	24,97	1458,84	157,40
	PCL	336	24,18	1375,75	194,60
	PCL	504	25,26	1428,38	265,20
	PCL	672	27,61	1486,99	288,10
kutinaza	PCL	168	22,62	1332,51	291,78
	PCL	336	22,28	1287,49	335,30
	PCL	504	19,63	1152,36	321,50

	PCL	672	21,07	1214,26	359,30
$\alpha$ -amilaza	PCL/GEL	168	12,10	17,47	232,60
	PCL/GEL	336	12,36	14,11	168,80
	PCL/GEL	504	11,82	16,32	288,80
	PCL/GEL	672	11,97	17,82	281,90
kutinaza	PCL/GEL	168	5,33	13,38	293,90
	PCL/GEL	336	4,64	9,24	303,10
	PCL/GEL	504	1,30	9,29	201,50
	PCL/GEL	672	2,32	7,83	179,60

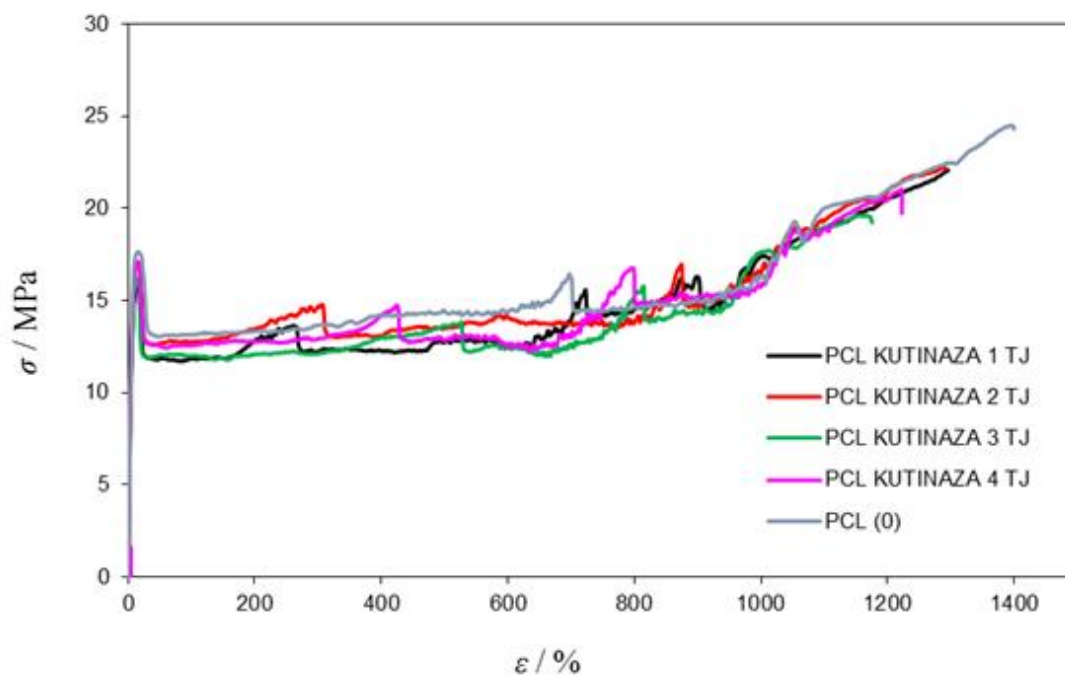


**Slika 53.** Krivulja naprezanje-istezanje PCL/GEL mješavine prije razgradnje

Na slici 54. i slici 55. prikazane su krivulje naprezanje-istezanje PCL polimera prije i tijekom 4 tjedna razgradnje u PBS otopini s  $\alpha$ -amilazom odnosno s kutinazom te je vidljivo da se oblik krivulja naprezanje-istezanje nije promijenio u odnosu na krivulju naprezanje-istezanje PCL polimera prije razgradnje.



**Slika 54.** Krivulje naprezanje-istezanje PCL polimera prije i tijekom 4. tjedna razgradnje u PBS otopini s  $\alpha$ -amilazom

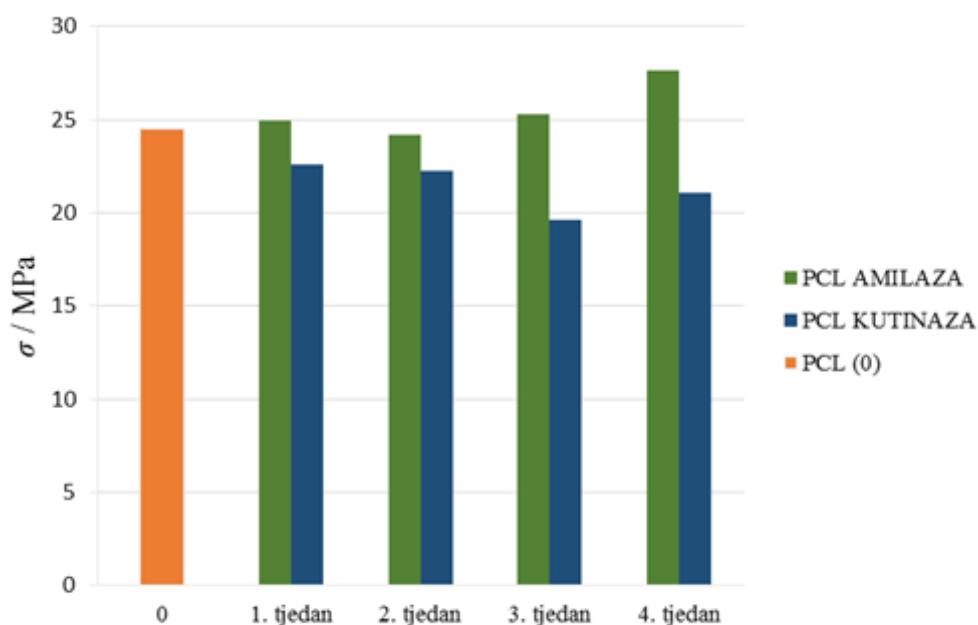


**Slika 55.** Krivulje naprezanje-istezanje PCL polimera prije i tijekom 4. tjedna razgradnje u PBS otopini s kutinazom

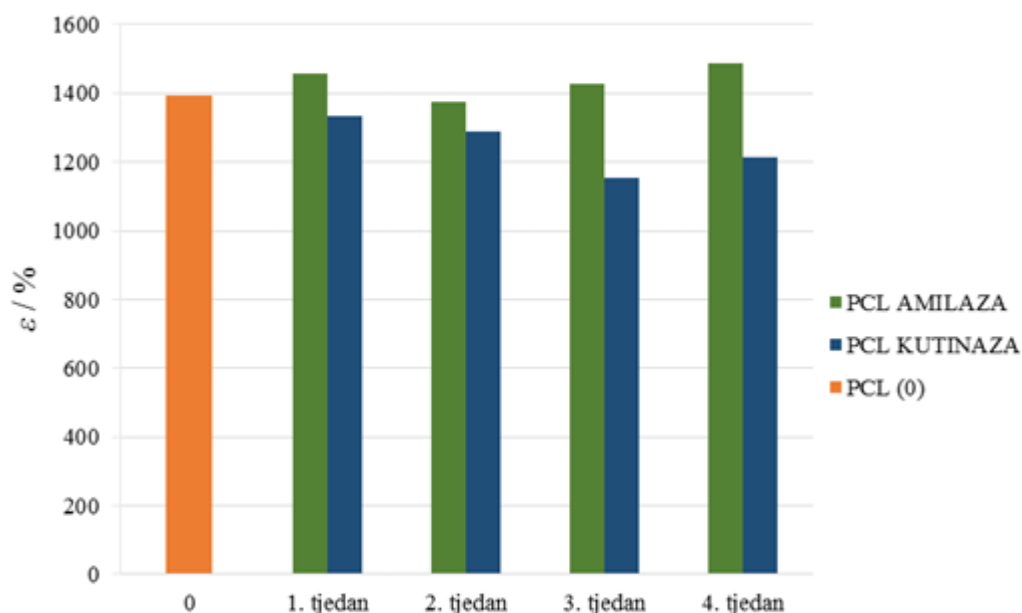
Kod uzoraka PCL-a tijekom 4. tjedna razgradnje u PBS otopini s  $\alpha$ -amilazom mehanička svojstva se bitno ne razlikuju od mehaničkih svojstava ishodnog PCL-a. Na površini uzorka starenog 4. tjedna nije vidljiva promjena u odnosu na površinu ishodnog PCL-a, a tijekom



enzimske razgradnje promjena mase uzorka je neznatna te se mehanička svojstva uzoraka nakon razgradnje PCL-a neznato razlikuju. Na temelju rezultata DSC analize vidljiva je promjena kristalnosti uzoraka starenih u mediju s  $\alpha$ -amilazom, nije utjecala na mehanička svojstva.



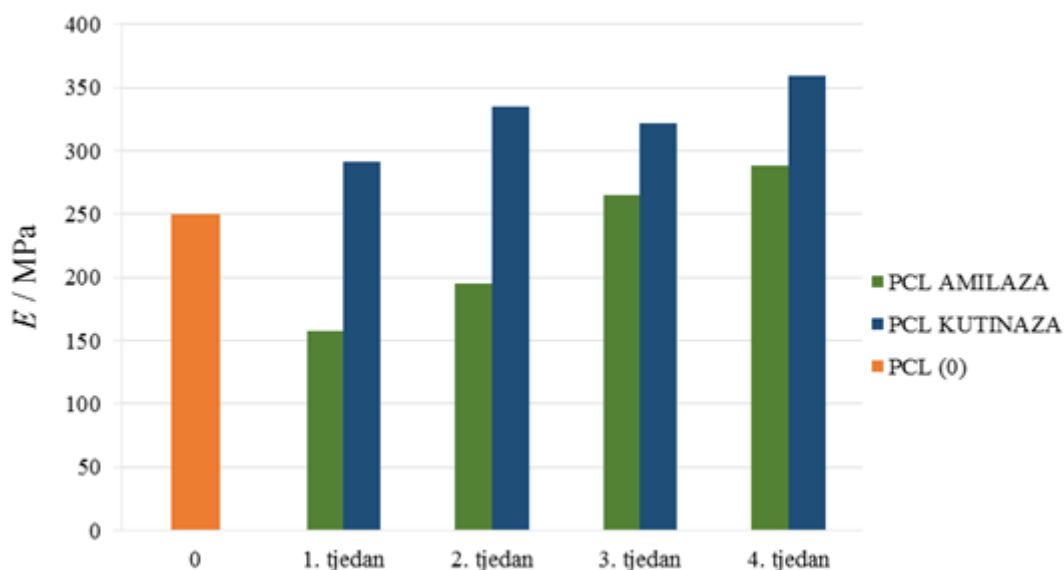
**Slika 56.** Vrijednost prekidnog naprežanja nakon enzimske razgradnje za uzorke PCL-a te vrijednost prekidnog naprežanja ne starenog PCL-a



**Slika 57.** Vrijednost prekidnog istezanja PCL polimera prije i nakon enzimske

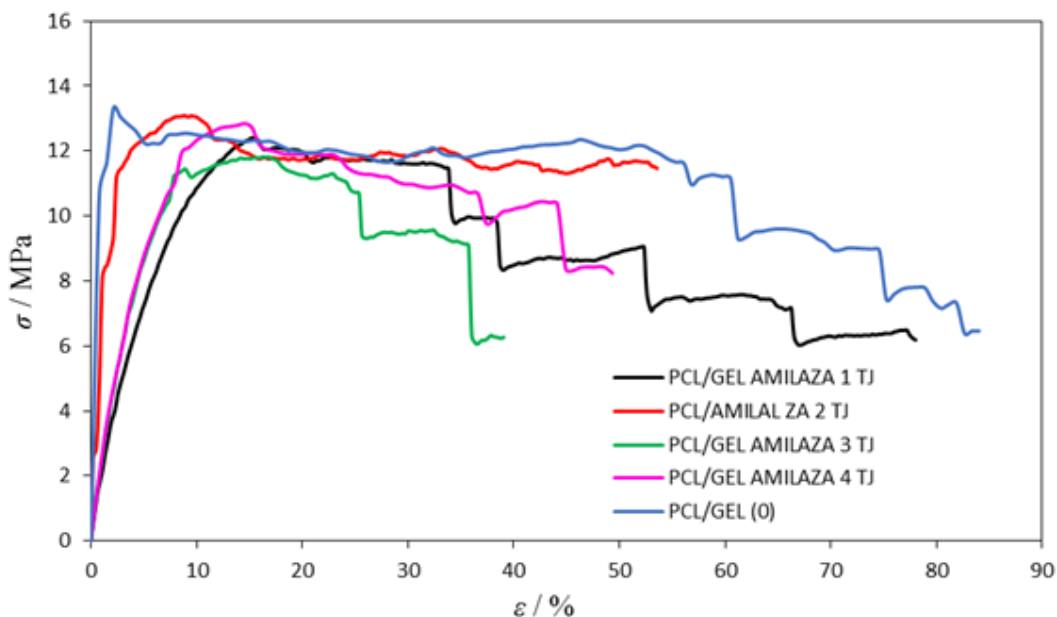
Vrijednost prekidnog istezanja i prekidne čvrstoće PCL polimera nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom uglavnom se smanjuje, dok je rastezni modul nešto veći od ishodnog PCL-

a, slika 57. Porast vrijednosti rasteznog modula upućuje na porast kristalnosti uzoraka s obzirom da je enzimskom razgradnjom uzoraka PCL-a u mediju s kutinazom na površini uzoraka razgrađena amorfna faza.

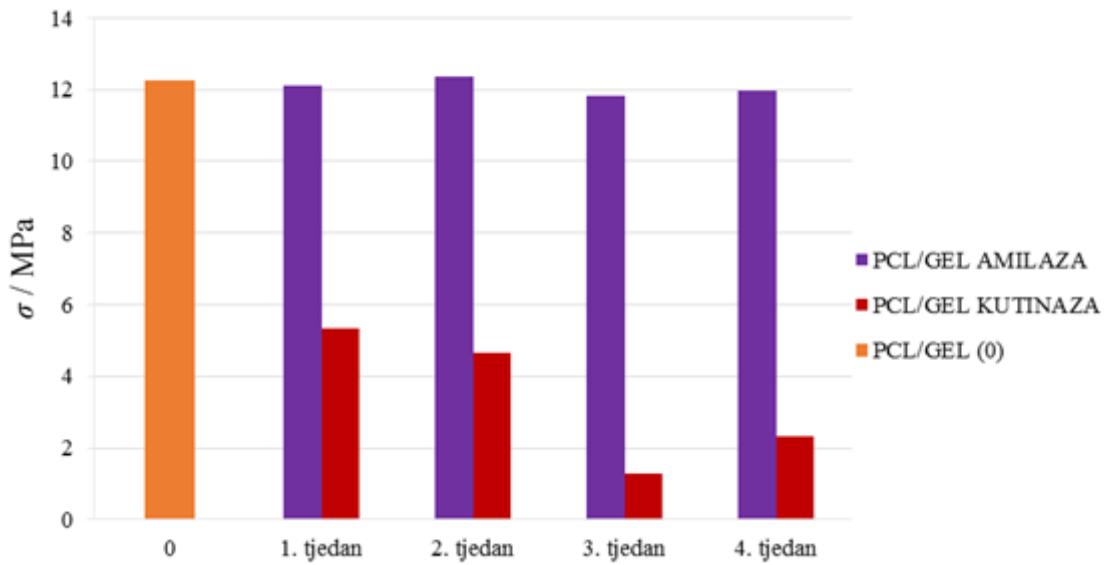


**Slika 58.** Vrijednost rasteznog modula ( $E$ ) prije i nakon enzimске razgradnje PCL polimera

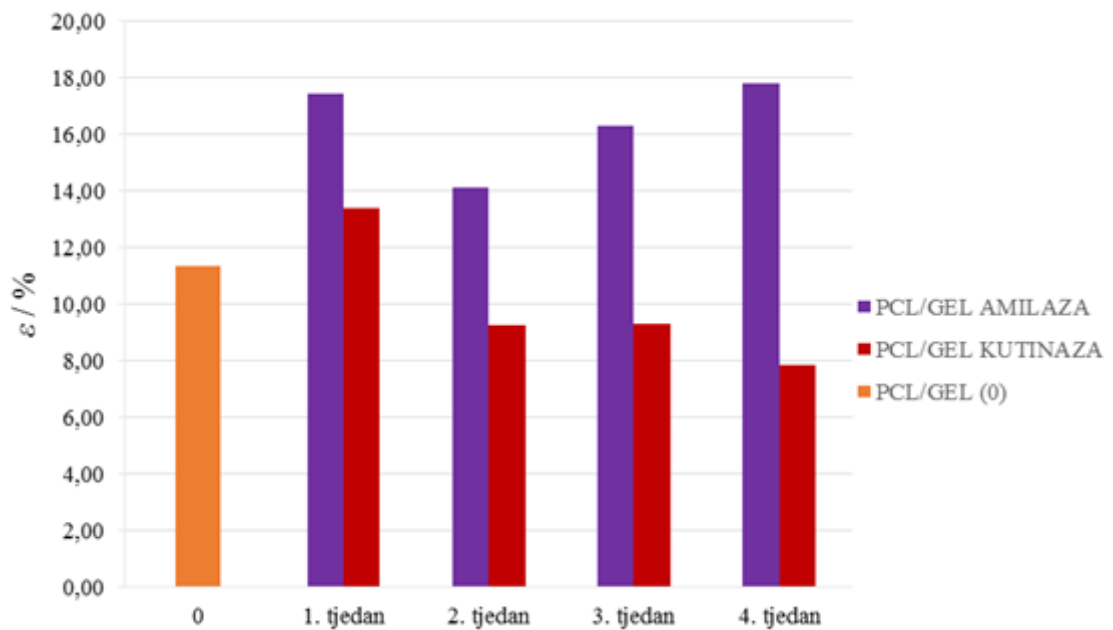
Na slici 59. prikazane su krivulje naprezanje-istežanje mješavine PCL/GEL prije i nakon razgradnj u PBS otopini s  $\alpha$ -amilazom te je vidljivo da se mehanička svojstva starenih mješavina PCL/GEL neznatno mijenjaju s vremenom razgradnje. Također je vidljivo da kod starenih uzoraka dolazi do hladnog tečenja, ali je istežanje prilikom hladnog tečenja manje.



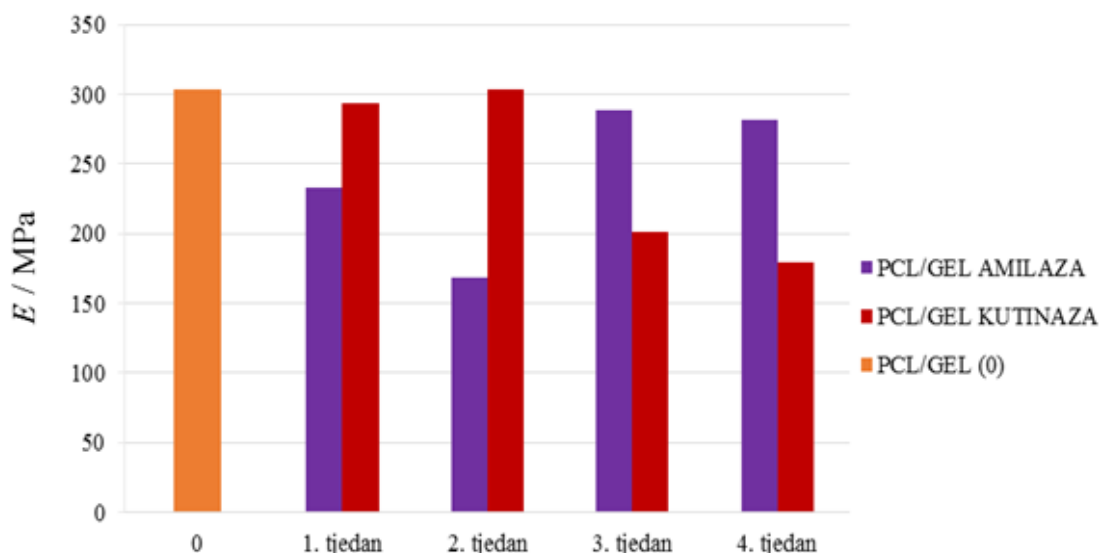
**Slika 59.** Krivulje naprezanje-istežanje PCL/GEL mješavina prije i nakon razgradnje u PBS otopini s  $\alpha$ -amilazom



**Slika 60.** Vrijednosti prekidnog naprezanja PCL/GEL mješavina prije i nakon enzimske razgradnje

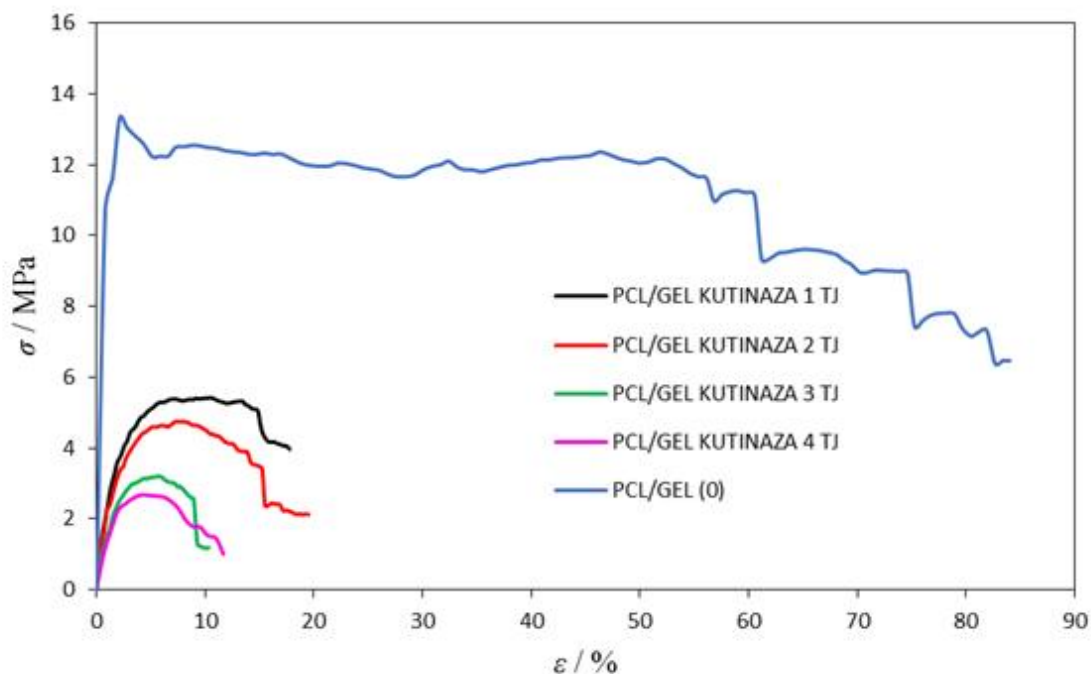


**Slika 61.** Vrijednosti prekidnog istezanja PCL/GEL mješavina prije i nakon enzimske razgradnje



**Slika 62.** Vrijednost rasteznog modula ( $E$ ) prije i nakon enzimske razgradnje

Na slici 63. prikazane su krivulje naprezanje-istezanje mješavine PCL/GEL prije i nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom te je vidljivo da su se mehanička svojstva PCL/GEL mješavine znatno promijenila, a promjena mehaničkih svojstava je izraženija s duljim vremenom enzimske razgradnje. Iz krivulja naprezanje-istezanje uzoraka nakon enzimske razgradnje vidljivo je da tijekom istezanja ne dolazi do hladnog tečenja.



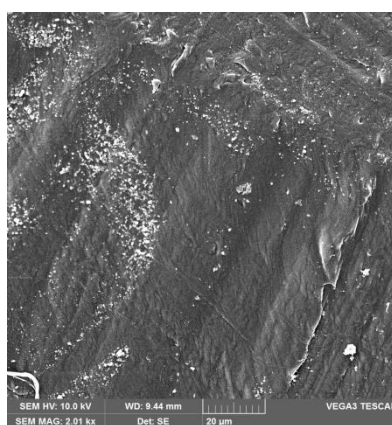
**Slika 63.** Krivulje naprezanje-istezanje uzoraka mješavine PCL/želatina (PCL/GEL) starenih u mediju s kutinazom te ne starene mješavine PCL/želatina (PCL/želatina 0)

## 5.5 Morfološka struktura

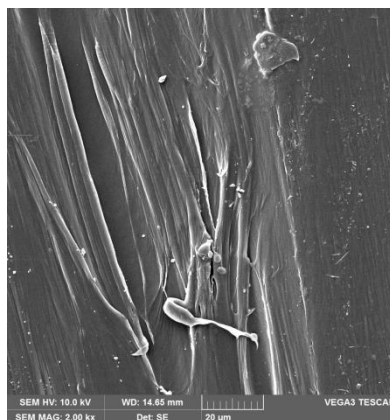
### 5.5.1 Elektronska pretražna mikroskopija, SEM

Elektronskom pretražnom mikroskopijom (SEM), ispitana je morfološka struktura PCL polimera i PCL/GEL mješavine prije i nakon 4. tjedna razgradnje u PBS otopini s enzimom kutinaze i  $\alpha$ -amilaze.

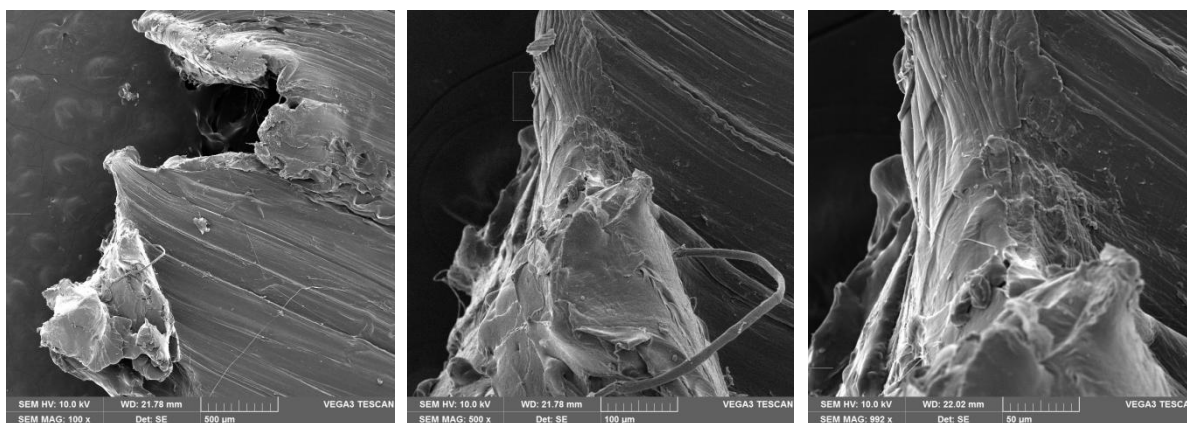
Na SEM mikrografiji (Slika 64.) PCL polimera vidljiva je neravna površina naizgled homogene i glatke površine. Na vratu epruvete nakon mehaničkog mjerenja uočava se orijentacija makromolekula u smjeru naprezanja, to jest došlo je do istežanja i usmjeravanja lanaca u smjeru djelovanje vanjske sile i konačnog popuštanja, što je prikazano na slici 65. i 66.



**Slika 64.** SEM mikrofotografije površine PCL polimera

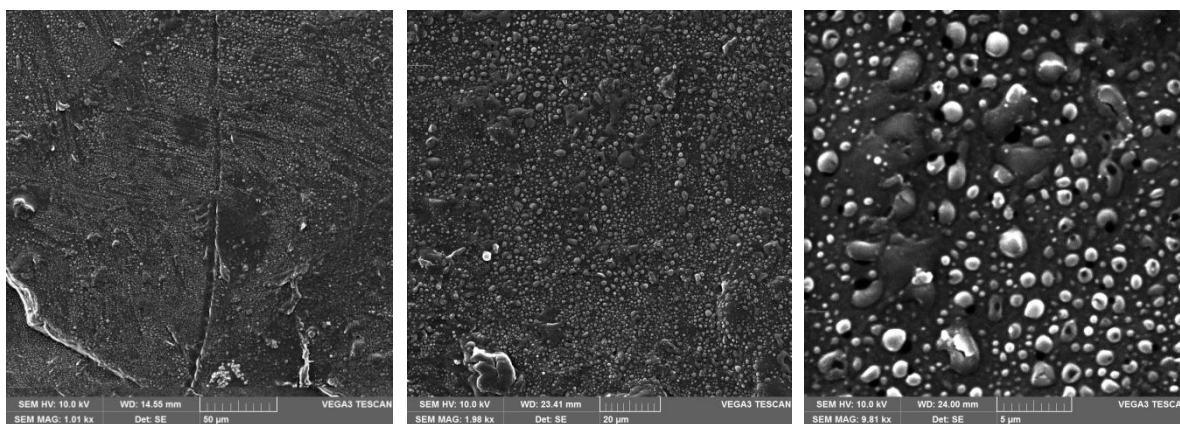


**Slika 65.** SEM mikrofotografije vrata PCL polimera

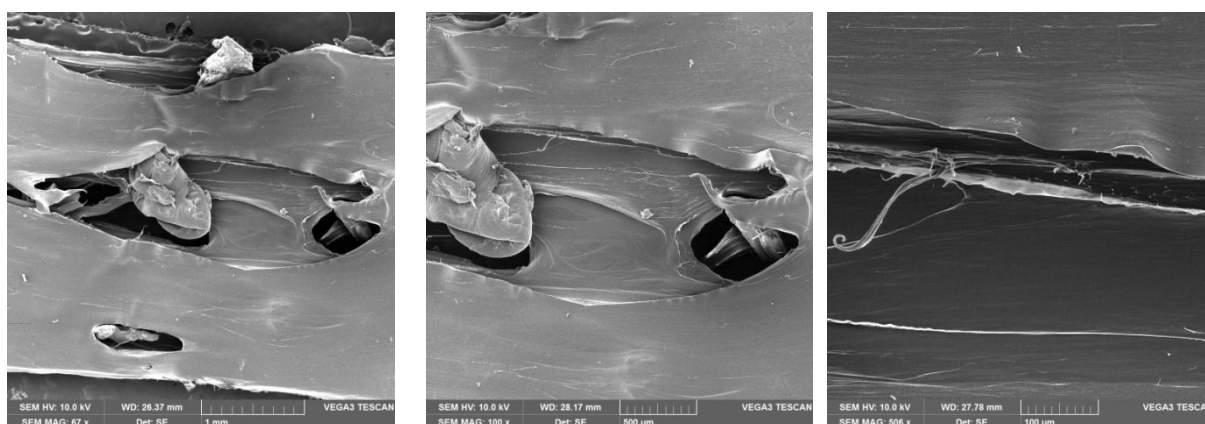


**Slika 66.** SEM mikrografija površine loma PCL polimera

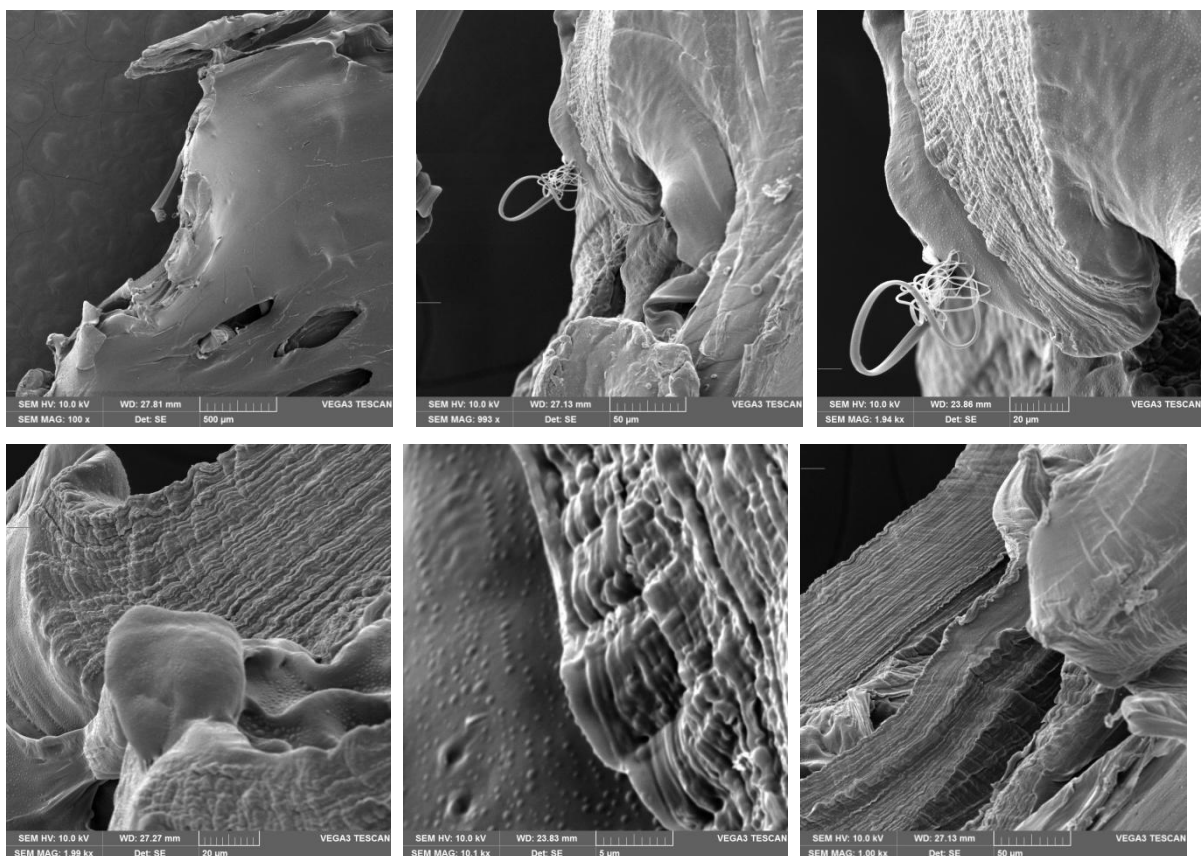
SEM mikrografija (slika 67.) PCL/GEL mješavine ukazuje na dobru dispergiranost želatine (bijeli kružići) u strukturi PCL-a. Na površini loma unutar šupljine uočava se nakupina želatine. Pretpostavlja se da je popuštanje došlo unutar čestice želatine, koja čini mekši dio strukture. Izdanci koji su uočljivi indikacija su smičnog naprezanja (slika 69.). Uočljiva je orijentacija makromolekula polimerne matrice u smjeru popuštanja. Nastale šupljine su nastale zbog proširenja mikropukotina (slika 68.) i u konačnici smičnog popuštanja matrice.



**Slika 67.** SEM mikrografija mješavine PCL/GEL

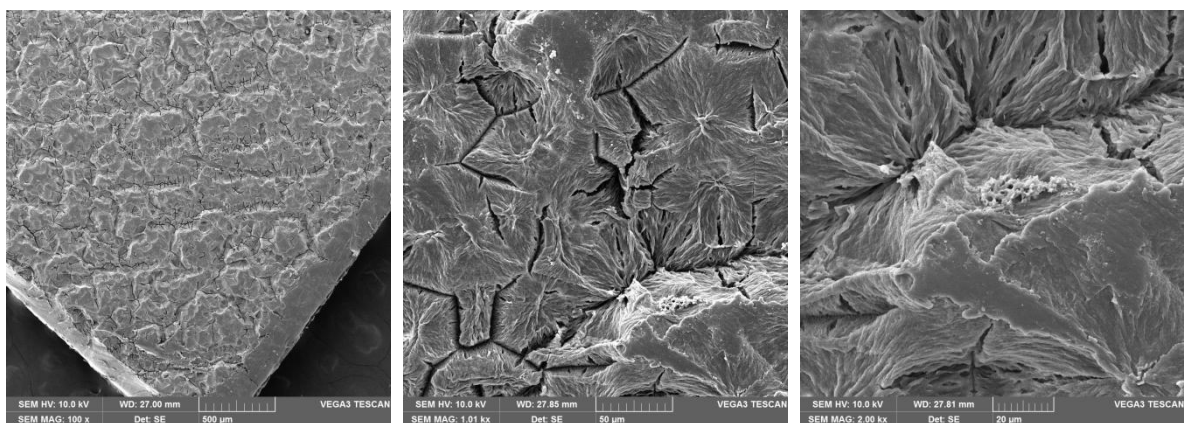


**Slika 68.** SEM mikrografija mješavine PCL/GEL

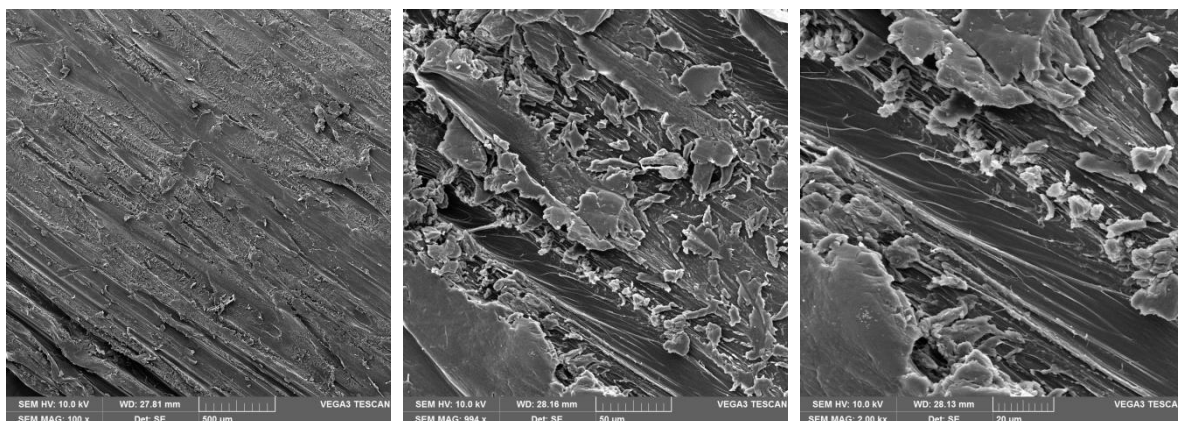


**SEM 69.** mikrografija mješavine PCL/GEL

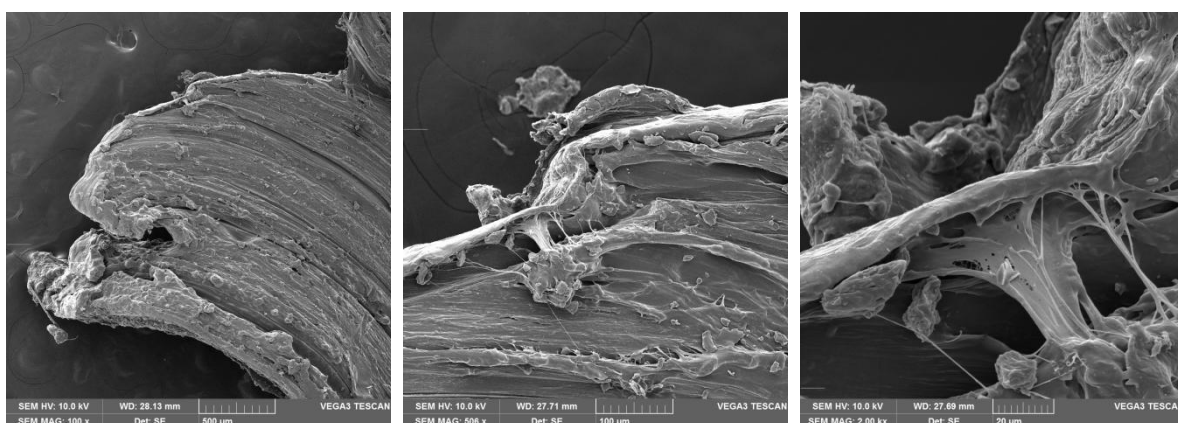
Na SEM morfologiji (slika 70.) uzoraka PCL polimera nakon 4. tjedna razgradnje u PBS otopini s kutinazom vidljiva je vrlo nagrižena površina s mikropukotinama. Mikropukotine predstavljaju slabo mjesto u strukturi oko kojih se koncentriralo naprezanje do konačnog popuštanja. Na površini PCL polimera nakon enzimske razgradnje s kutinazom jasno je vidljiva sferolitna struktura kristalne faze PCL-a, što potvrđuje da se tijekom razgradnje primarno razgrađuje amorfna faza. Na slici vrata prilikom naprezanja se uočava ostatak amorfne strukture u kojoj se makromolekule PCL-a orjenitaju u smjeru naprezanja (slika 71.). Izdanci upućuju na smično popuštanje matrice. Na površini loma uočljive su nakupine nagrižene površine materijala, a makromolekule PCL-a zadržavaju ishodni izgled (slika 72.).



**Slika 70.** SEM mikrografija PCL-a nakon četiri tjedna u mediju PBS/kutinaza

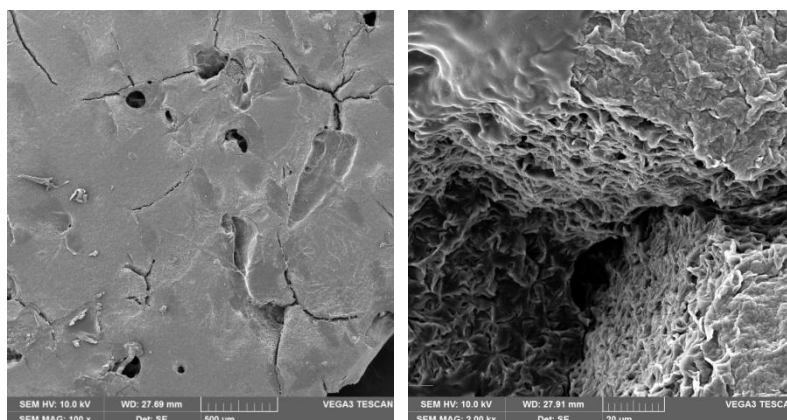


**Slika 71.** SEM mikrografija PCL-a nakon četiri tjedna u mediju PBS/kutinaza

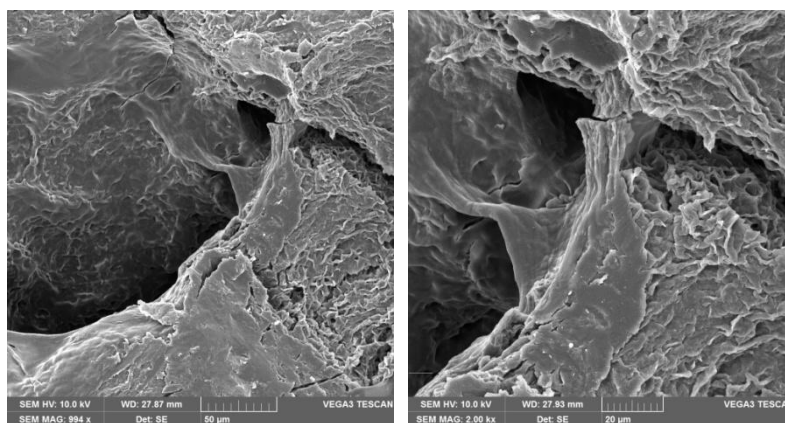


**Slika 72.** SEM mikrografija PCL-a nakon četiri tjedna u mediju PBS/kutinaza

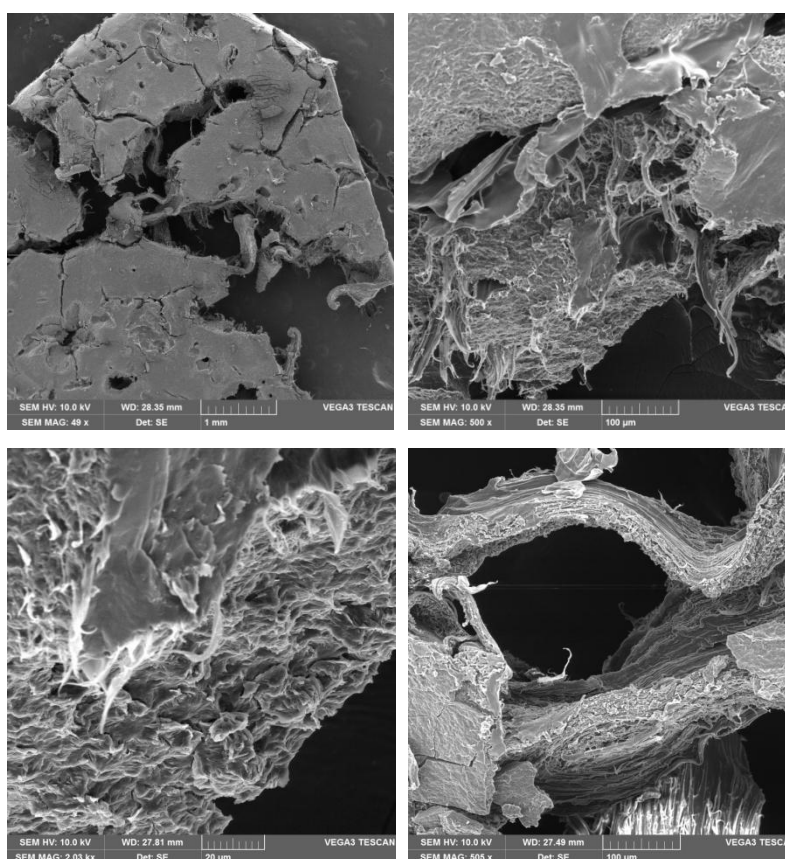
Na SEM mikrografiji (slika 73.) mješavine PCL/GEL nakon četiri tjedna u mediju PBS/kutinaza uočljive su mikropukotine na kojim mjestima je bila prisutna želatina. Mikropukotine su mjesta popuštanja, te se one šire u šupljine. Izdanci su indikatori smičnog naprezanja, tj. popuštanja. Dodatkom gela PCL-u gubi se žilavost materijala i povećava se njegova krtoš (slika 74). Kao posljedica apsorpcije enzima u unutrašnjosti želatine nagrizanje nije samo površinsko, nego se nagrizanje događa i unutrašnjosti PCL-a.





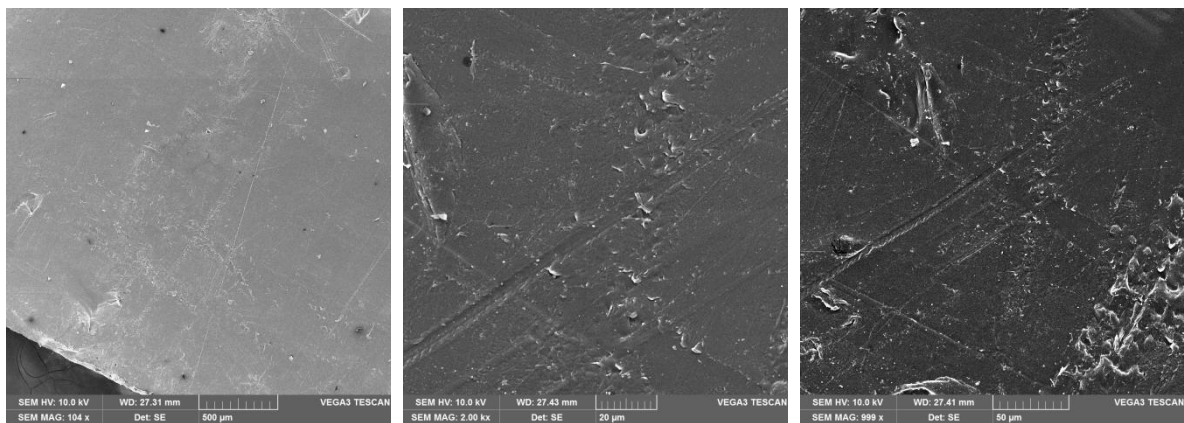


**Slika 73.** SEM mikrografija mješavine PCL/GEL nakon četiri tjedna u mediju PBS/kutinaza

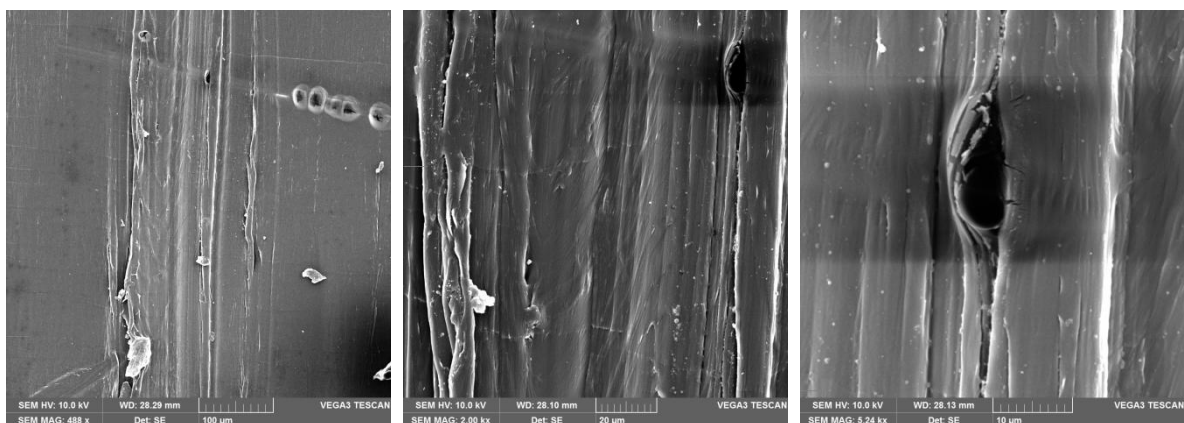


**Slika 74.** SEM mikrografija mješavine PCL/GEL nakon četiri tjedna u mediju PBS/kutinaza

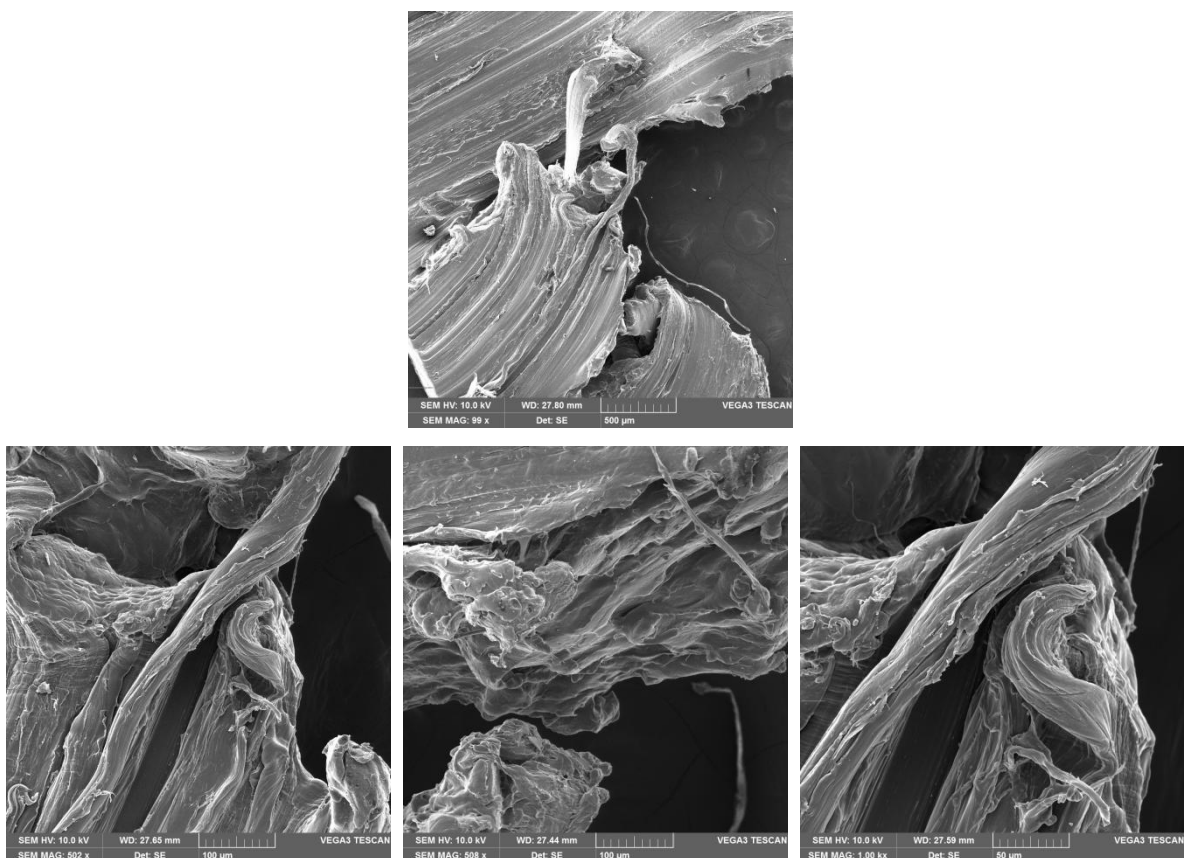
Na SEM mikrografiji (slika 75.) PCL-a nakon četiri tjedna u mediju PBS/ $\alpha$ -amilaza uočljiva je očuvana površina naspram PCL-a nakon četiri tjedna u mediju PBS/kutinaza. Amorfna struktura je očuvana i makromolekule se orjenitaju u smjeru naprezanja (slika 76.). Tijekom naprezanja mikropukotine se šire i nastaju šupljine. Istezanjem makromolekula dolazi do staranja izdanaka što upućuje na smično naprezanje (slika 77.).



**Slika 75.** SEM mikrografija PCL-a nakon četiri tjedna u mediju PBS/ $\alpha$ -amilaza

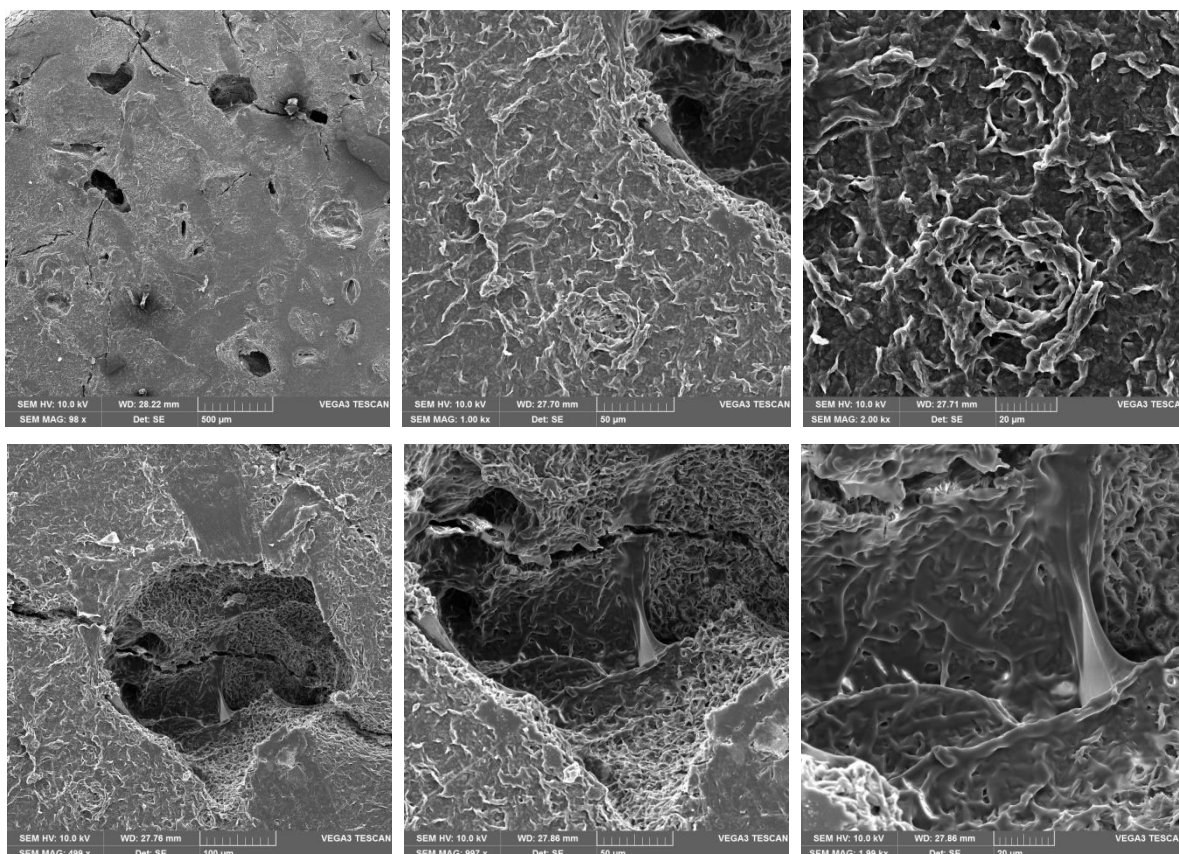


**Slika 76.** SEM mikrografija PCL-a nakon četiri tjedna u mediju PBS/ $\alpha$ -amilaza

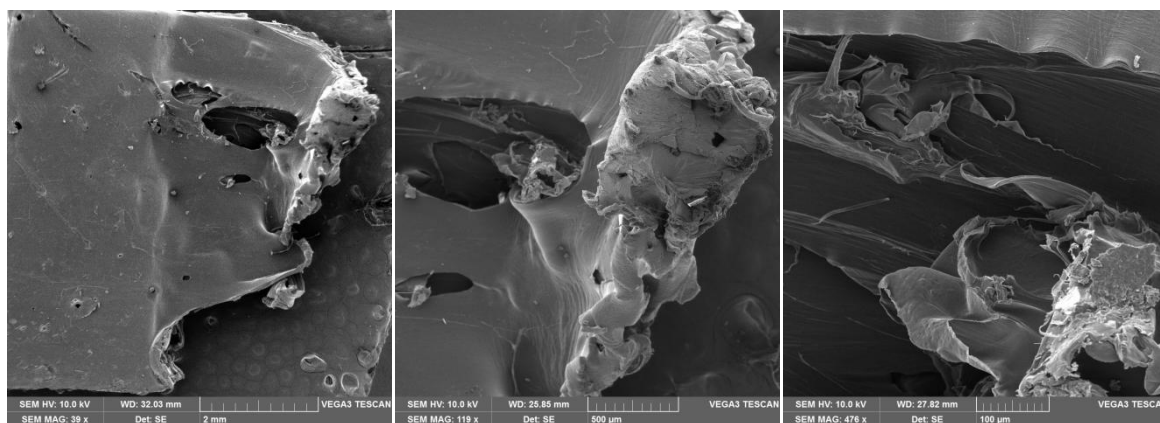


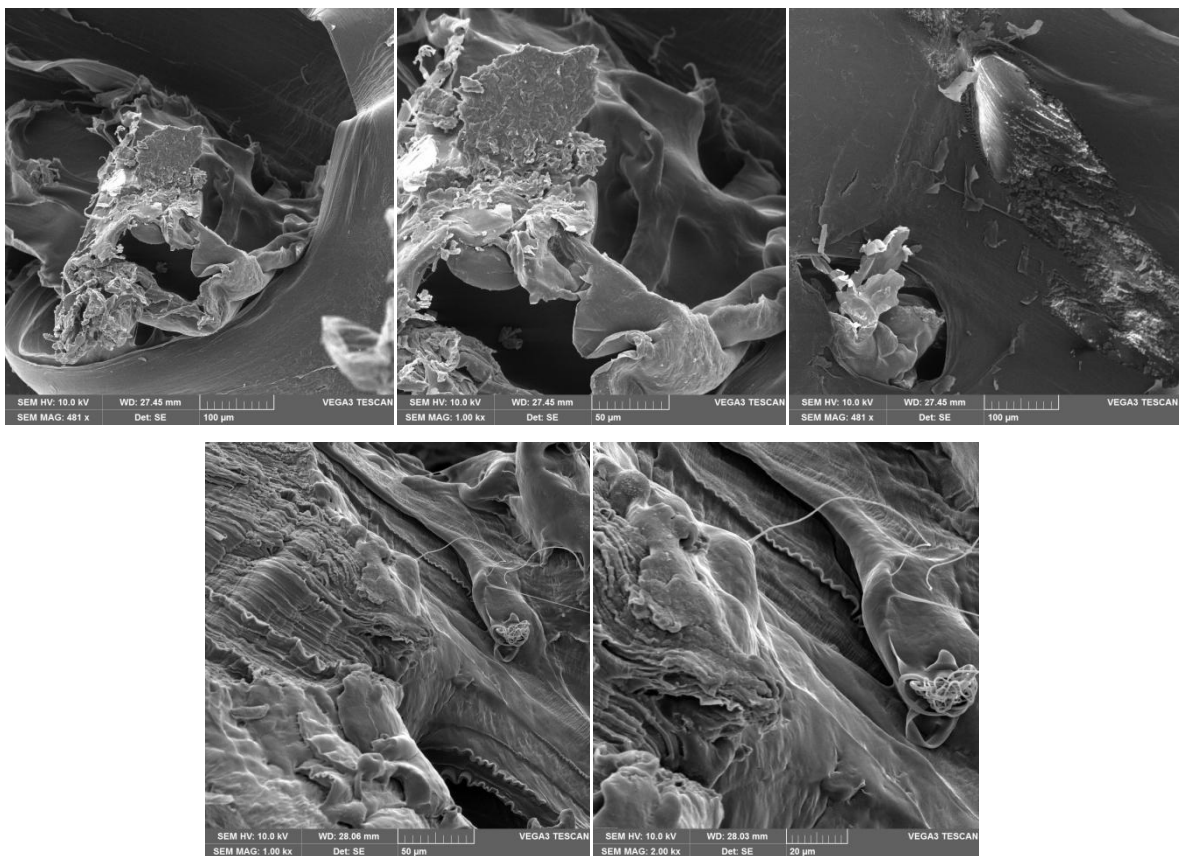
**Slika 77.** SEM mikrografije PCL-a nakon 4. tjedna u mediju PBS/ $\alpha$ -amilaza

SEM mikrografija mješavine PCL/želatina (slika 78.) nakon četiri tjedna u mediju PBS/ $\alpha$ -amilaza sličnija je strukturi iste mješavine u mediju PBS/kutinaza. Želatina je apsorpcijom enzima omogućila nagrizanje enzima unutar strukture PCL-a. Na površini se uočava formiranje cvjetaste strukture. Unutar područja gdje je bila želatina vidljiva je amorfnu strukturu. Želatina je slabije mjesto u strukturi i kao slabije mjesto u strukturi dolazi do stvaranja i širenja šupljina i konačnog pucanja materijala (slika 78.).



**Slika 78.** SEM mikrografija mješavine PCL/želatina nakon 4. tjedna u mediju PBS/ $\alpha$ -amilaza





**Slika 79.** SEM mikrografija mješavine PCL/GEL nakon 4. tjedna u mediju PBS/ $\alpha$ -amilaza



## 6. ZAKLJUČCI

- Promjena mase uzoraka ukazuje na značajne razlike u mehanizmima razgradnje PCL i PCL/GEL mješavine s enzimima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze.
- FTIR-ATR spektroskopijom potvrđene su značajne promjene u strukturi nastale enzimskom razgradnjom u PBS otopini s kutinazom. Peptidne veze ukazuju na prisutnost enzima na površini PCL-a i PCL/GEL mješavine, što ukazuje na vezivanje enzima za površinu.
- U PCL/GEL mješavini uočavaju se promjene u strukturi nakon duljeg vremena razgradnje u otopini  $\alpha$ -amilaze.
- Promjena molekulske mase ukazuje na površinsku razgradnju PCL polimera i PCL/GEL mješavine, erozijom površine.
- Parametri adhezije pokazuju dobre interakcije između PCL polimera i želatine (GEL).
- Porast hidrofilnosti potvrđuje značajne promjene na površini PCL polimera i mješavine PCL/GEL nakon enzimске razgradnje kutinazom i  $\alpha$ -amilaze.
- DSC analiza pokazuje promjenu porasta udjela kristalne faze tijekom enzimске razgradnje.
- Toplinska stabilnost PCL polimera i PCL/GEL mješavine ne mijenja znatno, izuzev PCL/GEL mješavine, gdje dolazi do porasta u odnosu na netretirani PCL što je posljedica razgradnje i/ili otapanja želatine.
- Dodatak želatine značajno utječe na mehanizam i brzinu razgradnje PCL polimera.



## **7. ZAHVALA**

*Najljepše hvala mentorici prof. dr. sc. Mireli Leskovic na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i uloženom vremenu koje nam je posvetila tijekom izrade ovog rada.*

*Veliko hvala znanstvenom novaku, dr. sc. Fabiu Faraguni koji nam je pomogao pri mjerenju kromatografije isključenja po veličini (SEC), tehničaru Borisu Pleši na izuzetnoj pomoći pri mjerenju mehanike materijala i dr. sc. Zrinki Buhin Štrulić koja nam je pomogla pri snimanju SEM mikrofotografije.*

*Velika zahvala i svim djelatnicima Zavoda za inženjerstvo površina i Zavoda za polimerno inženjerstvo i organsku kemiju na pruženoj pomoći i gostoprimstvu.*



## 8.LITERATURA

- [1] [www.bioartificial-organs.net/en/home/tissue-engineering.html](http://www.bioartificial-organs.net/en/home/tissue-engineering.html) (pristup 20.lipnja 2014.)
- [2] Fröhlich, M., Grayson, W.L., Wan, L.Q., Marolt, D., Drobic, M., Vunjak-Novakovic, G., Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance, *Current Stem Cell Research & Therapy*, 3(4) (2008) 254-26
- [3] Hutmacher, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21 (2000) 2529-2543
- [4] Zhou, H., Lee, J., Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 7 (2011) 2769-2781
- [5] Stevens, M.M., Marini, R.P., Schaefer, D., Aronson, J., Langer, R., Prasad Shastri, V., In vivo engineering of organs: The bone bioreactor, *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.*, 102(32) (2005) 11450-11455.
- [6] Allo, B.A., Costa, D.O., Dixon, J.S., Mequanint, K., Rizkalla, A.S., Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration, *Journal of Functional Biomaterials*, 3 (2012) 432-463
- [7] Sdat-Shojai, M., Khorasani, M-T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 7591-7621.
- [8] S.I., Abd Razak, N.F.A., Sharif, W.A., Rahman, Biodegradable Polymers and their Bone Applications, *International Jurnal of Basic and Applies Sciences Vol:12, No:01*.
- [9] [http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/bone\\_mechanical.php](http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/bone_mechanical.php) ( zadnji pristup 30. Veljače 2015.)
- [10] J.C. Middleton, A.J. Tipton: Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials* 21 (2000) 2335-2346.)
- [11] P.A., Gunatillake, Ra., Adhikari: Biodegradable Synthetic Polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials Vol. 5.* (2003) 1-16.
- [12] J.M.Colwell; Synthesis of Polycaprolactone Polymers for Bone Tissue Repair, *School of Physical and Chemical Sciences* (2006)
- [13] M. Labet, W. Thielemans: Synthesis of polycaprolactone: a review, First published as an Advance Article on the web (2009)
- [14] D. Barbier-Baudry, L. Brachais, A. Cretu, R. Gattin, A. Loupy, D. Stuergea, Synthesis of polycaprolactone by microwave irradiation – an interesting route to synthesize this polymer via green chemistry, *Environ Chem Lett* (2003) 1:19–23.
- [15] M.A.Woodruff, D.W.Hutmacher: *Prog Polym Sci* 35 (2010) 1217-1256

- [16] G.Sivalingam, G.Madras: Thermal degradation of binary physical mixtures and copolymers of poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(D, L-lactide), poly(glycolide) in *Polymer Degradation and Stability* 84 (2004) 393-398
- [17] M.Mochizuki, M.Hirano, Y.Kanmuri, K.Kudo, Y.Tokiwa: *J Appl Polym Sci* 55 (1995) 289
- [18] Karlson, P.: *Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1993.*
- [19] Araujo. R: *Molecular biotechnology approaches towards the optimization of enzymes for advanced textile applications, Disertacija, Universidade do Minho, Minho, 2008*
- [20] Murphy, C.A., Cameron J.A., Huang, S.J., Vinopol, R.T. : *Fusarium Polycaprolactone Depolymerase Is Cutinase, Applied and environmental Microbiology*, vol. 62, str 456-460, 1996
- [21] Longhi, S., Cambillau, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1441, str. 185 – 196, 1999
- [22] Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., Macedo, G. A.: Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? , *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 31, str. 608-613, 2011
- [23] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=3QPC&opt=3&bionumber=1>
- [23a] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1PPI&bionumber=1>
- [24] Horvathova, V., Janček, Š., Šturdik, E. Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties, *Biologia*, vol. 55/6, str. 605-615, 2000
- [25] Brayer, G. D., Luo, Y., Withers, S. G., The structure of human pancreatic  $\alpha$ -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes, *Protein Science*, vol. 4, str. 1730-1742, 1995
- [26] Sharma, A., Satyanarayana, T. Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications, *Process Biochemistry*, vol. 48, str. 201-211, 2013
- [27] Bogue, R.H. 1922. *The Chemistry and Technology of Gelatin and Glue*, McGraw Hill, New York, NY.
- [28] GMIA, *Gelatin handbook*, members of GMIA, 2012.
- [29] Kirk-Othmer, *Food and Feed technology*, John Wiley & Sons, 2. izdanje, 2008., str. 856-863
- [30] Tuba, F., Borbas, L., Nagy, P., Olah, L.: Hydrolysis Induced Deterioration of Compressive Properties of Poly- $\epsilon$ -Caprolactone, *FME Transactions*, vol. 37, str. 33-37, 2009
- [31] Ndazi B. S., Karlsson S., *eXPRESS Polymer Letters* 5 (2) (2011) 119-131
- [ 32] Ndazi B. S., Karlsson S., *eXPRESS Polymer Letters* 5 (2) (2011) 119-131; Seyed S.H., Somaye T., Ali Z. Arjomand M-Z., *J. Appl. Polym. Sci.* 103 (2007) 2304-2309
- [33] Steven J. Barnes, Lawrence P. Harris, *Tissue Engineering Roles, Materials and Applications*, Nova Science Publishers, Inc. (2008).

- [34] Vijayananda, K., Pattanayakb, D. K., Rama Mohanb, T. R., Banerjeea, R., 18 (2), (2005), 73-83
- [35] Mashhadikhan, M., Soleimani, M., Parivar, K. i Yaghmaei, P., Avicenna J Med Biotech 2015; 7(1): 32-38
- [36] Fowkes F. M., The Journal of Physical Chemistry, 1962, 66 (2), str. 382-382 ; Good R. J.: Contact angle, wetting and adhesion: a critical review, u Conatact Angle, Wettability and Adhesion (Ed. K. L. Mittal), VSP, Utrech, (1993.), str. 3-36



## 9. SAŽETAK

Razgradnja implantiranih materijala u ortopedskom inženjerstvu tkiva od iznimne je važnosti jer otklanja potrebu uklanjanja implantata u drugom kirurškom zahvatu, te osigurava prostor za rast prirodnog tkiva. Stoga je razgradnju potrebno postići brzinom koja omogućuje regeneraciju prirodnog tkiva na mjestu oštećenja. U međuvremenu, djelomično razgrađeni nosači (*scaffolds*) moraju održavati njihovu mehaničku cjelovitost, dok novoformirano tkivo ne preuzme funkciju i potpuno ih zamijeni. Razgradnju materijala pokreće nekoliko mehanizama, uključujući hidrolizu i enzimsku razgradnju.

Najistaknutija skupina biorazgrađivih materijala su alifatski poliesteri, jer su se pokazali korisnima za niz biomedicinskih primjena. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) je hidrofoban, semikristalasti polimer, kojem se kristalnost smanjuje povećanjem molekulske mase. Njegova dobra topljivost, niska temperatura taljenja (59-64°C) i izuzetna kompatibilnost u mješavinama potaknula je opsežna istraživanja njegove potencijalne primjene u medicini. Međutim, njegovi nedostaci kao biomaterijala za ortopedske namjene su njegova spora razgradnja i neodgovarajuća mehanička svojstva.

Alifatski se poliesteri razgrađuju jednim ili kombinacijom više mehanizama npr. hidrolizom, enzimskom, mikrobnom i toplinskom razgradnjom. Brzina razgradnje je ovisna o nekoliko čimbenika, uključujući i stupanj kristalnosti, hidrofilnost, sastav kopolimera, molekulsku masu, molekulnu građu, veličinu i geometriju uzoraka, i uvjete u okruženju razgradnje poput pH i temperature. Razgradnja u okolišu je praktički nepromjenjiva *in vivo*, stoga svojstva polimera u konačnici određuju brzinu razgradnje. Jedan od načina da se utječe na brzinu razgradnje jest uvođenje dodataka koji će povećati hidrofilnost PCL-a.

U ovom radu istražen je utjecaj dodatka želatine kao proteinske i hidrofilne komponente na brzinu hidrolitičke razgradnje i svojstva poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) (PCL) i mješavine poli( $\epsilon$ -kaprolaktona)/želatina (PCL/GEL) uz prisutnost enzima kutinaze i  $\alpha$ -amilaze.  $\alpha$ -amilaza je enzim koji se prirodno nalazi u ljudskom tijelu dok je kutinaza enzim svojom strukturom sličan lipazama, enzimima koji se također nalaze u ljudskom tijelu. Rezultati ukazuju na značajne promjene svojstava i brzine razgradnje poli( $\epsilon$ -kaprolaktona) dodatkom želatine, uz enzim kutinazu.

**Ključne riječi:** poli( $\epsilon$ -kaprolakton), želatina, enzimska razgradnja

## 10. SUMMARY

Degradation of the implanted material in orthopedic tissue engineering is of a great importance because it eliminates the need of removing implants in another surgical procedure, and provides space for natural tissue growth. Therefore, it is necessary to achieve the degradation rate similar to the regeneration rate of the natural tissue at the site of damage. In the meantime, partially degraded scaffolds must maintain mechanical integrity, until the newly formed tissue takes their functions and completely replaces them. Material degradation includes several mechanisms such as hydrolysis and enzymatic degradation.

The most prominent group of biodegradable materials are aliphatic polyesters, since they have shown to be useful for a wide range of biomedical applications. *Poly- $\epsilon$ -caprolactone* (PCL) is a hydrophobic, *semi-crystalline* polymer which crystallinity is reduced with increasing the molecular weight. PCLs good solubility, low melting temperature (59-64 °C) and excellent compatibility in blends initiated numerous researches for its potential applications in biomedicine. However, its limitations as biomaterial for orthopedic applications are slow degradation and inadequate mechanical properties.

Aliphatic polyesters degrade in one or in combination of several mechanisms, for example hydrolysis, enzymatic, microbial and thermal decomposition. Degradation rate is dependent on several factors, including the degree of crystallinity, hydrophilicity, copolymer composition, molecular weight, molecular structure, size and geometry of the sample, and environment conditions such as pH and temperature. Environmental degradation is practically unchanged *in vivo*, therefore, polymer properties, eventually, determine the degradation rate. One of the ways to influence the degradation rate is the integration of supplements that will increase the hydrophilicity of the PCL.

In this paper influence of gelatin addition, as a protein and hydrophilic component, on the hydrolytic degradation rate and properties of *poly( $\epsilon$ -caprolactone)* (PCL) and mixture of *poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin* (PCL/GEL) with the presence of enzymes cutinase and  $\alpha$ -amylase has been studied.  $\alpha$ -amylase is an enzyme that naturally occurs in the human body, while the cutinase has similar structure to lipases, enzymes that are also found in the human body. Results indicate the significant changes of the *poly( $\epsilon$ -caprolactone)* properties and degradation rate with the addition of gelatin and enzyme cutinase.

**Keywords:** , *poly( $\epsilon$ -caprolactone)*, gelatin, enzymatic degradation

