

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mirna Vujnović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mirna Vujnović

Enzimska razgradnja PCL/BW mješavina

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mirela Leskovic
Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Mirela Leskovic
doc. dr. sc. Ljerka Kratofil-Krehula
prof. dr. sc. Sanja Lučić-Blagojević

Zagreb, rujan 2016.

SAŽETAK

Enzimska razgradnja PCL/BW mješavina

Biorazgradivi materijali su od iznimne je važnosti u inženjerstvu tkiva jer se uklanja potreba za novim kirurškim zahvatom primjenjenog implantata, te osigurava prostor za rast prirodnog tkiva. U procesu razgradnje vrlo je važno postići brzinu koja omogućuje regeneraciju prirodnog tkiva na mjestu oštećenja. Biorazgradivi nosačimoraju održavati mehaničku cjelovitost sve dok novo tkivo ne preuzme funkciju i potpuno ih zamijeni. Razgradnju materijala pokreće nekoliko mehanizama, uključujući hidrolizu i enzimsku razgradnju.

Najistaknutija skupina biorazgradivih materijala su alifatski poliesteri koji su pokazali primjenu za niz biomedicinskih aplikacija. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) je linearni alifatski poliestar hidrofobne prirode. PCL je polimer semikristalne strukture kojem se kristalnost smanjuje povećanjem molekulske mase. Njegova dobra topljivost, niska temperatura taljenja (59-64 °C) i dobra kompatibilnost u mješavinama potaknula je opsežna istraživanja njegove potencijalne primjene u medicini. Međutim, njegovi nedostaci kao biomaterijala u inženjerstvu tkiva su spora razgradnja i neodgovarajuća mehanička svojstva.

Alifatski se poliesteri, time i PCL, razgrađuju jednim ili kombinacijom više mehanizama hidrolizom, enzimskom, mikrobnom i toplinskom razgradnjom. Brzina razgradnje ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući stupanj kristalnosti, hidrofilnost, sastav kopolimera, molekulsku masu, molekulnu građu, veličinu i geometriju uzoraka, te uvjete u kojima se razg poput pH i temperature. Razgradnja u okolini je nepromjenjiva *in vivo*, stoga svojstva polimera u konačnici određuju brzinu razgradnje.

Pčelinji vosak (eng. *beeswax*, BW) je složena smjesa zasićenih i nezasićenih linearnih i složenih monoestera, ugljikovodika, slobodnih masnih kiselina, slobodnih masnih alkohola i manjeg udjela drugih tvari koje proizvode pčele radilice. Izrazito hidrofoban karakter, kristalna struktura i niska temperatura taljenja (62-65 °C) karakteristike su BW-a.

U ovom radu istražen je utjecaj pčelinjeg voska (BW) na brzinu hidrolitičke razgradnje i svojstva poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL) i mješavine poli(ϵ -kaprolakton)/pčelinji vosak (PCL/BW) uz prisutnost enzima lipaze, koja se nalazi u ljudskom tijelu.

Rezultati ukazuju na značajne promjene svojstava i brzine razgradnje poli(ϵ -kaprolaktona) dodatkom BW, uz enzim lipazu. Na osnovi mjerenja kontaktnog kuta s različitim ispitnim kapljeninama, proračunati su parametri adhezije koji ukazuju na značajnije interakcije između PCL i BW polimera. Hidrofilnost površine PCL/BW mješavina različitog sastava, nakon enzimске razgradnje s lipazom, se povećala što je vidljivo iz smanjenja vrijednosti kontaktnog kuta. U PCL/BW mješavinama BW faza se preferirano smješta na površini. Razgradnja uslijed djelovanja lipaze na PCL polimer i BW odvija mehanizmom površinske erozije. Primjenom površinskih metoda karakterizacije (FTIR-ATR, SEM) utvrđene su strukturne promjene PCL i BW mješavina nakon enzimске razgradnje. Na osnovi dobivenih rezultata DSC mjerenja možemo zaključiti da su temperature taljenja čistih komponenata PCL-a i BW-a vrlo slične, dok se temperature kristalizacije značajno razlikuju. Porast kristalnosti je posljedica apsorbirane vode što se opaža u ranijoj fazi enzimске razgradnje. Apsorbirana voda ima plastificirajuće djelovanje na PCL polimer te čini njegove

lance znatno pokretljivijima. BW komponenta PCL/BW mješavine razara kristalnu strukturu PCL polimera. Toplinska razgradnja PCL odvija se u jednom, dok se razgradnja BW odvija u dva stupnja što je utvrđeno primjenom termogravimetrijske analize. Jedan razgradni stupanj PCL/BW mješavina s manjim udjelom voska (do 50 %) ukazuje na njihovu mješljivost. PCL polimer povećava toplinsku stabilnost BW-a. Vrijednosti mehaničkih svojstava čistih komponenta PCL-a i BW-a se značajno razlikuju, a porastom udjela BW faze svojstva PCL/BW mješavina se narušavaju. Tijekom enzimske razgradnje dolazi do sniženja prekidne čvrstoće i prekidnog istezanja, te porasta rasteznog modula, posebice kod BW-a.

Ključne riječi: poli(ϵ -kaprolakton), pčelinji vosak, PCL/BW mješavina, enzimska razgradnja, lipaza

SUMMARY

Enzymatic degradation of PCL/BW blends

Biodegradable materials are of great importance in tissue engineering because it eliminates the need for a new surgical procedure applied implants, and provides space for the natural tissue growth. In the process of decomposition is very important to achieve the degradation rate that allows the regeneration of the natural tissue at the site of damage. Biodegradable scaffolds must maintain mechanical integrity until new tissue takes their function and completely replaces them. Material degradation runs several mechanisms, including hydrolysis and enzymatic degradation.

The most prominent group of biodegradable materials are aliphatic polyesters which have shown useful for a lot of biomedical applications. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a linear aliphatic polyester hydrophobic nature. PCL is semy-crystalline polymer which crystallinity is reduced increasing the molecular weight. It is good solubility, low melting temperature (59-64 °C) and good compatibility in blends initiated numerous researches for its potential applications in biomedicine. However, his limitations as biomaterial in tissue engineering are slow decomposition and inadequate mechanical properties.

Aliphatic polyesters, like PCL, degrade by one or a combination of several mechanisms of hydrolysis, enzymatic, microbial and thermal decomposition. The rate of degradation dependent on several factors, including the degree of molecular structure, molecular weightcopolymer composition, crystallinity, hydrophilicity, size and geometry of the sample, and the conditions such as pH and temperature. Environment degradation is unchangeable *in vivo*, therefore, polymer properties ultimately determine the degradation rate.

Beeswax (BW) is a complex mixture of saturated and unsaturated linear and complex monoesters, hydrocarbons, free fatty acids, free fatty alcohol and a lower share of other substances produced by bees. Extremely hydrophobic character, crystal structure and low temperatures range (62-65 °C) are performances of BW.

In this work, the influence of beeswax (BW) on the hydrolytic degradation rate and properties of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and blends of poly(ϵ -caprolactone)/beeswax (PCL/BW) in the presence of a enzymelipase, which is found in the human body.

Results indicate significant changes in properties and degradation rate of poly(ϵ -caprolactone) whit the addition of BW, in enzyme lipase. For the measurement of contact angle are used different test liquid, calculate the parameters of adhesion that indicate significant interactions between PCL and BW polymer. Hydrophilic surfaces PCL/BW blends of different composition are increased, after enzymatic digestion with lipase, which demonstrated by the decrease in the value of the contact angle. In PCL/BW blends, BW component are preferably placed on the surface. PCL polymer and BW degrade by mechanism of surface erosion. By applying the method of surface characterization (FTIR-ATR, SEM) were determined structural changes PCL and BW mixture after enzymatic degradation. Results based on DSC measurements can be concluded that the melting temperature of pure components PCL and BW very similar, while the temperature of crystallization significantly different. The increase in crystallinity is the result of absorbed water that occurs at earlier stage of enzymatic degradation. Absorbed water has a plasticizing

effect on the polymer PCL and makes his chains much more flexible. BW component of PCL/BW blends destroys the crystal structure of the PCL polymer. Thermal degradation of PCL is in one degree while BW degrade in two degrees, which determined by using thermogravimetric analysis. One degradation degree of the PCL/BW blends with less wax (50 %) indicates their miscibility. PCL polymer increases the thermal stability of BW. The values of the mechanical properties of components PCL and BW are significantly different, and increasing of BW properties PCL/BW blends is damaging. During enzymatic degradation, tensile strength and elongation are reduced, while tensile modules increases, specially for BW.

Key words: poly(ϵ -caprolactone), beeswax, PCL/BW blends, enzymatic degradation, lipase

Najljepše hvala prof. dr. sc. Mireli Leskovic na stručnom vodstvu, razumijevanju i strpljenju, pomoći i savjetima, te uloženom vremenu prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Luciji Foglar na gostoprimstvu i ustupljenom instrumentu potrebnom za eksperimentalni dio diplomskog rada, te doc. dr. sc. Ljerki Kratofil-Krehula na pomoći pri snimanju SEM mikrofotografije.

Zahvaljujem svim članovima Zavoda za inženjerstvo polimernih površina na srdačnom gostoprimstvu, pomoći i razumijevanju tijekom izrade ovoga rada.

Od sveg srca zahvaljujem svojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, savjetima, podršci i razumijevanju te svemu što su mi pružili. Hvala što ste moj najjači izvor energije.

Mirna

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Polimeri	3
2.1.1. Podjela polimera	3
2.1.2. Polimerne mješavine	5
2.1.2.1. Termodinamički kriterij mješljivosti	6
2.2. Biorazgradivi materijali	7
2.2.1. Biorazgradivi polimeri	7
2.2.2. Mehanizam razgradnje biopolimera	10
2.2.2.1. Hidrolitička razgradnja PCL-a	12
2.2.3. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)	12
2.2.4. Primjena PCL-a u biomedicini	13
2.3. Enzimi	15
2.3.1. Struktura enzima	15
2.3.2. Aktivno mjesto	17
2.3.3. Lipaza	19
2.3.3.1. Enzimski razgradnja PCL-a	21
2.4. Pčelinji vosak (BW)	22
2.5. Površinski fenomeni	24
2.5.1. Slobodna površinska energija	24
2.5.2. Parametri adhezije	25
2.5.3. Matematički modeli	28
2.6. Površinske metode	30
2.6.1. Određivanje slobodne energije površine	30
2.6.2. Fourier transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR-ATR)	30
2.6.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	31
2.7. Toplinske metode	33
2.7.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)	33
2.7.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)	33
2.8. Mehanička svojstva	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO	36
3.1. Materijali	36
3.2. Priprava PCL/BW mješavina	37
3.3. Priprava Hankove otopine soli (HBSS)	39
3.4. Postupak enzimske razgradnje	40
3.5. Tehnike karakterizacije	42
3.5.1. Određivanje površinskih svojstava	42
3.5.1.1. Mjerenje kontaktnog kuta	42
3.5.1.2. FTIR-ATR analiza	43
3.5.1.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	44

3.5.2. Određivanje toplinskih svojstava.....	45
3.5.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)	45
3.5.2.2. Termogravimetrijska analiza (TGA).....	46
3.5.3. Određivanje mehaničkih svojstava.....	46
4. REZULTATI I RASPRAVA	47
4.1. Utjecaj enzima lipaze na pomjenu mase	47
4.1.1. Promjena mase tijekom 2 tjedna.....	47
4.1.2. Promjena mase tijekom 5 tjedana.....	50
4.2. Karakterizacija površine	53
4.2.1. Slobodna energija površine i parametri adhezije PCL i PCL/BW mješavina.....	53
4.2.2. Mjerenje kontaktnog kuta vodom i dijodometanom.....	53
4.2.3. Kontaktni kut s vodom – nakon enzimske razgradnje.....	56
4.2.4. Rezultati FTIR-ATR analize	60
4.2.5. Rezultati SEM analize	68
4.3. Toplinska svojstva PCL i PCL/BW mješavina	73
4.3.1. Rezultati DSC-a	73
4.3.2. Rezultati TGA analize	83
4.4. Mehanička svojstva PCL i PCL/BW mješavina	92
4.4.1. Rezultati mehaničkih ispitivanja.....	92
5. ZAKLJUČAK.....	100
6. LITERATURA	102
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	105

1. UVOD

Biopolimeri su kemijske tvari koje se sastoje od više manjih jedinica međusobno povezanih kovalentnim vezama, te se mogu podijeliti na prirodne i sintetske polimere. Prirodni polimeri (svila, kolagen, fibrin, hijaluronska kiselina...) imaju jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva, no ograničenu primjenu zbog promjene svojstava i sklonost ka onečišćenju bakterijama, za razliku od sintetskih polimera koji imaju ujednačena i predvidljiva svojstva. Stoga su brojna istraživanja posvećena razvoju sintetskih biomaterijala, čimbenicima koji utječu na mehanizam i kinetiku njihove razgradnje te poboljšanju svojstava s ciljem utvrđivanja materijala pogodnih za određenu namjenu. Poznavanje mehaničkih, fizikalnih i kemijskih svojstava, mehanizma i brzine razgradnje te identifikacije produkata je od presudne važnosti pri odabiru i dizajniranju materijala. Biorazgradivi polimeri omogućavaju ponovni rast i obnovu tkiva, a nakon toga se razgrađuju i izbacuju iz organizma.

Alifatski poliesteri su najčešće korišteni sintetski polimeri u biomedicini (inženjerstvo tkiva, kardiovaskularno inženjerstvo), među kojima je i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL). PCL je linearni, hidrofobni poliester, kristalne strukture koji se široko primjenjuje u području biomedicine za konce, pločice, srčane stentove, sredstvo za prijenos lijekova, obrovu živaca i tkiva.

Mehanizam razgradnje materijala moguć je na nekoliko načina uključujući enzimsku razgradnju i hidrolizu. Lipaze predstavljaju jednu od najvažnijih grupa biokatalizatora koje imaju velikuprimjenu u biotehnološkim procesima, pa i u enzimskoj razgradnji PCL-a. Razgradnja većine sintetskih polimera nastaje mehanizmom površinske erozije sloja, odnosno hidrolizom njihovih esterskih (polarnih) veza. Biorazgradivi materijali koji se koriste u brojnim aplikacijama, kao alifatski poliesteri razgrađuju se jednim ili kombinacijom više mehanizama (hidroliza, enzimska, toplinska, mikrobn razgradnja).

Razgradnja poli(ϵ -kaprolaktona) je proces koji se odvija u dva stupnja. U prvom stupnju se razgrađuju amorfn, manje organizirana područja uslijed djelovanja vode na esterske veze polimernog lanca, a brzina reakcije je povezana sa sposobnosti polimera da apsorbira vodu. Drugi stupanj započinje hidrolizom kristalnih područja od ruba prema sredini polimera pri čemu nastaju oligomerne molekule. Hidrolizom se cijepa esterski lanac, a pri tome nastale krajnje karboksilne skupine djeluju kao katalizatori. Razgranati produkti manjih molekulskih masa kataliziraju hidrolizu PCL-a, odnosno razgradnju – autokataliza. Produkti razgradnje nastaju na površini i u velikom omjeru, a samo oni na površini se otapaju u okolnom mediju. Razgradnja je brža u unutrašnjosti nego na površini polimera zbog akumulacije karboksilnih skupina što ukazuje na nejednoliku razgradnju. Tijekom enzimске razgradnje dolazi do promjene mase koja se opaža tek nakon metaboličke razgradnje fragmenata, odnosno difuzije manjih jedinica iz mase materijala, nakon čega se gubitak mase brzo povećava.

Pčelinji vosak (*eng. beeswax*, BW) proizvode pčele radilice starosti do 35 dana lučenjem voštanih ljestvica čiji je sastav ovisan o brojnim čimbenicima. BW je složena smjesa zasićenih i nezasićenih linearnih i složenih monoestera, ugljikovodika, slobodnih masnih kiselina, slobodnih masnih alkohola i manjeg udjela drugih tvari.

Cilj ovog rada je enzimska razgradnja poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL) i PCL/BWpolimernih mješavina različitog sastava u enzimu lipazi *Candida cylindracea* u vremenskom intervalu od 5 tjedana i lipazi *Thermomyces lanuginosus* tijekom 2 tjedna, pri temperaturi od 20 °C.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Polimeri

Pojam polimer je grčkog podrijetla, potječe od riječi poli (*grč. πολυ*) i meros (*grč. μερος*). Švedski kemičar Jöns Jakob Berzelius 1833. godine, kemijske spojeve koji imaju jednaki sastav, a razlikuju se veličinom molekulske mase nazvao je polimerima. Eduard Simon, berlinski lijekarnik, 1839. godine je vjerovatno proveo prvu reakciju polimerizacije u laboratoriju. Zagrijavanjem uljaste tekućine nastale destilacijom prirodnog balzama, storaksa, dobio je krutu, prozirniju masu koju je nazvao stirolo. Na osnovu opisa ovog postupka, 1866. godine francuski kemičar Mark Berthelot je reakciju nastajanja velike, asociirane molekule sastavljene od većeg broja manjih molekula, nazvao reakcijom polimerizacije. 1924. njemački kemičar Herman Staudinger uvodi pojam i naziv makromolekula.¹

Makromolekule su kemijski spojevi vrlo velikih relativnih molekulskih masa koje mogu biti u rasponu od nekoliko tisuća do nekoliko milijuna, te velikih dimenzija, promjera od 10 do 1000 nm, stoga ulaze u područje koloidnog razdjeljenja tvari. Većina makromolekula sastavljena od istovrsnih ponavljajućih jedinica naziva se polimerima.^{1,2} Sintetski organski polimeri se ubrajaju među najvažnije tehničke materijale i vlakna te su obilježje 20. stoljeća koje se naziva i „polimerno doba“. Zamjena su za uobičajene materijale kao što su metal, drvo, keramiku i staklo, pa o polimerima valja govoriti kao o novim materijalima, budući da je njihov nagli razvoj ubrzao razvoj mnogih područja ljudske djelatnosti.^{1,2}

2.1.1. Podjela polimera

Polimerene tvari razvrstavaju se na nekoliko načina i skupina: ¹

1. Prema podrijetlu

- a) Prirodni polimeri (celuloza, škrob, svila, vuna, pamuk, kaučuk) – nastaju biosintezom u prirodi gdje se prikupljaju i potom se prerađuju u polimerni materijal ili se sintetiziraju iz monomera prirodnog porijekla.
- b) Sintetski polimeri
 - Organskog porijekla (ugljkovodici) – polazne sirovine dobivaju se iz nafte te se nazivaju i petrokemijski polimeri.
 - Anorganskog porijekla – polimeri koji ne sadrže ugljikove atome u osnovnom lancu, već sadrže metale, elemente IV periodnog sustava (Si, Ge, Sn, P≡N).

2. Prema vrsti ponavljajućih jedinica

- a) Homopolimeri – jedna vrsta ponavljajućih jedinica
- b) Kopolimeri – dvije ili više vrsta ponavljajućih jedinica. Prema tipu kopolimerizacije razlikujemo:

- Statistički kopolimer – nasumična, nepravilna struktura raspodjela dviju monomernih jedinica duž kopolimernog lanca.



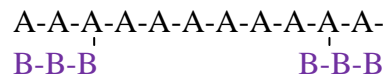
- Alterirajući kopolimer – dvije monomerne jedinice su u ekvimolarnim količinama, naizmjeničan raspored mera.



- Blok kopolimer – duge sekvencije (blokovi) ponavljanih jedinica pojedine vrste monomera.

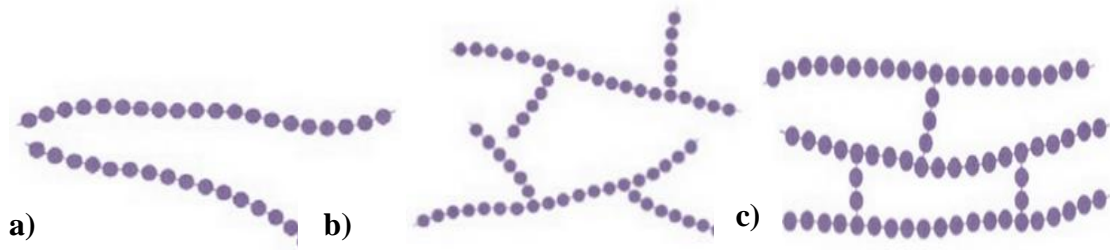


- Graft kopolimer – temeljni lanac se sastoji od jedne vrste ponavljanih jedinica, na koji je vezan jedan ili više bočnih lanaca druge vrste monomernih jedinica



3. Prema oblicima molekula

- Linearni – ponavljane jedinice linearnih makromolekula vezane su u kontinuiranom nizu u lancu (slika 1. a))
- Granati – u granatim makromolekulama za neke od mera glavnog lanca vezani su bočni lanci (slika 1. b))
- Umreženi – bočni lanci u umreženim makromolekulama međusobno su povezani kovalentnim vezama (slika 1. c)).



Slika 1. Ovisno o vrsti mera reakcijom polimerizacije mogu nastati slijedeće strukture:
a) linearna, b) granata, c) umrežena ²

4. Prema primjenskim svojstvima

- Polipasti (plastična svojstva)
 - Termoplasti (ili plastomeri)
 - Termoseti (ili duromeri)
- Elastomeri (elastična svojstva)

2.1.2. Polimerne mješavine

Polimerne mješavine su smjese dvaju ili više polimera ili kopolimera, s novim poboljšanim svojstvima u odnosu na pojedinu komponentu.³ Svojstva polimernih mješavina osim o sastavu, ovise i o stupnju mješljivosti (kompatibilnosti), međudjelovanju komponenata i drugim čimbenicima što omogućava podešavanje fizičkih, kemijskih, preradbenih i primjenskih svojstava u širokom rasponu.¹ Mješljivost, kristalnost i morfologija dvaju polimera su ključni parametri koji određuju svojstva mješavine. Struktura mješavina određena je mješljivošću njezinih komponenata.⁴

Neki od razloga pripreme polimernih mješavina su:

- Razvoj materijala željenih svojstava
- Poboljšanje fizikalnih i mehaničkih svojstava mješavina čineći ih boljim u odnosu na pojedine polimere u mješavini
- Dobivanje visoko kvalitetnih mješavina iz polimera sa sinergističkim međudjelovanjem
- Prilagodba svojstava mješavine prema zahtjevima kupca
- Mogućnost industrijskog recikliranja.^{1,3,4}

Miješanjem dvaju polimera mogu se dobiti mješavine koje su mješljive kod svih sastava (potpuno mješljive), mješljive pri određenim sastavima (djelomično mješljive) ili nemješljive kod svih sastava (potpuno nemješljive).^{1,5} Binarne polimerne mješavine mogu se podijeliti prema kristalnosti na: amorfne/amorfne, kristalne/amorfne i kristalne/kristalne mješavine.⁴



Slika 2. Prikaz podjele polimera prema morfološkoj građi (kristalnosti) s lijeva na desno: amorfna, semikristalna i kristalna struktura

Potpuno mješljive polimerne mješavine su smjese polimernih komponenata koje zadovoljavaju termodinamički uvjet mješljivosti ($\Delta G_m < 0$). Zbog specifičnih međudjelovanja polimernih komponenata kao što su vodikove veze, dipol-dipol ili kiselo-bazne veze postiže se termodinamički uvjet postojanja jednofaznog sustava. Ove mješavine su optički prozirne, posjeduju dobra mehanička i toplinska svojstva (mijenjaju se promjenom udjela pojedinog polimera). Djelomično mješljive mješavine karakteriziraju odvojene faze uz istovremeno prodiranje dijelova molekula jednog polimera u fazu drugog i obrnuto, ovisno o sastavu i temperaturi. Kod mješavina nemješljivih polimera dolazi do odvajanja faza, odnosno Gibbsova energija miješanja je pozitivna ($\Delta G_m > 0$). Polimer prisutan u manjem udjelu predstavlja

diskontinuiranu fazu, dok polimer u veće udjelu stvara kontinuiranu fazu. Potpuno nemješljive mješavine su heterogene, optički neprozirne lošijih svojstava od svojstava pojedinih komponenata. Kako bi se poboljšala primjenska svojstva mješavina dodaju se kompatibilizatori (blok ili cijepljeni kopolimeri) pri čemu je nužno postići stabilnost (u primjeni ne smije doći do odvajanja faza) i ponovljivost (zadržavanje strukture u uvjetima prerade).^{1,5}

Miješanjem dva amorfna polimera može se dobiti homogena polimerna mješavina na molekularnoj razini ili heterogena, fazno odijeljena polimerna mješavina. Na mješljivost dvaju ili više polimera utječu dva osnovna čimbenika – slobodna Gibbsova energija miješanja i stupanj međumolekulskih interakcija. Mješljivost polimera ovisi o interakcijama između svih komponenata u sustavu pa su tako nepolarni polimeri velikih molekulskih masa, kod kojih nisu prisutne jake interakcije, rijetko međusobno mješljivi. Ako su prisutne samo disperzne sile između molekula polimera u polimernoj mješavini pri niskim temperaturama može se očekivati djelomično mješljiv sustav.^{4,5}

U praksi je vrlo mali broj potpuno mješljivih polimera, uglavnom nastaju djelomično ili potpuno nemješljive polimerne mješavine. Jednostavan način za predviđanje mješljivosti polimera je procjenom veličina iz jednadžbe (1) na temelju različitih modela (npr. Flory-Hugginsov model).⁵ Najjednostavniji i najsigurniji eksperimentalni način određivanja mješljivosti dvaju polimera je preko temperature staklastog prijelaza. Dva potpuno mješljiva polimera imaju jednu temperaturu staklastog prijelaza koja se nalazi između staklišta čistih polimera, a ovisi o udjelu pojedinog polimera. Dvije temperature staklastog prijelaza koje se približavaju jedna drugoj, odnosno ne mijenjaju se u odnosu na čiste komponente, ukazuju na djelomično ili nemješljive polimerne mješavine.^{4,5,6}

2.1.2.1. Termodinamički kriterij mješljivosti

Miješanje dvaju polimera može se promatrati kao otopina čvrstih tvari i prikazati kao promjenu slobodne Gibbsove energije miješanja (1). Osnovni i nužan uvjet mješljivosti neke mješavine je negativna vrijednost Gibbsove energije miješanja.⁵

$$\Delta G_m = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

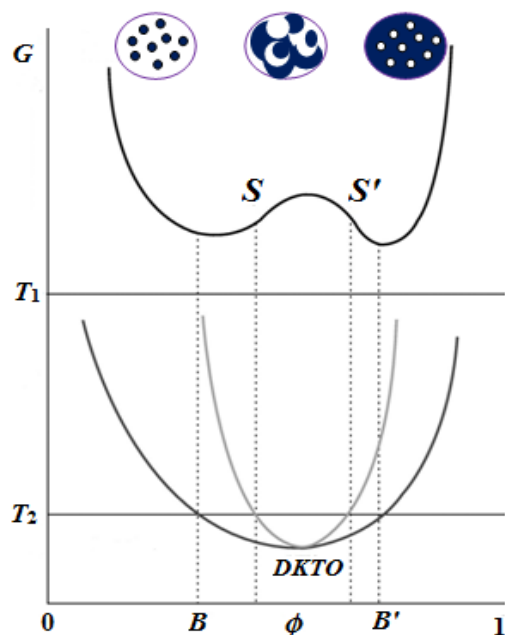
gdje je: ΔG_m – slobodna Gibbsova energija miješanja

ΔH – entalpija miješanja (toplina miješanja)

ΔS – entropija miješanja

Osim uvjeta $\Delta G_m < 0$, mješljivi polimerni sustavi pri stalnom tlaku i temperaturi s volumnim udjelom komponente (ϕ_i), moraju zadovoljiti uvjet:⁵

$$(\partial^2 \Delta G) / (\partial \phi_i^2) > 0 \quad (2)$$



Slika 3. Grafički prikaz utjecaja temperature i sastava na mješljivost polimernih mješavina uz pojavu donje kritične temperature otopine

Utjecaj temperature i sastava na mješljivost polimernih mješavina prikazan je na slici 3. Površina koja odvaja jednofazna od dvofaznih područja naziva se binodalna krivulja. Točke infleksije S i S' na temperaturi T_2 određuju spinodalnu krivulju. Područje potpune mješljivosti u čitavom području sastava, dakle ispunjeni osnovni termodinamički uvjeti su pri temperaturi T_1 . Ukoliko se polimerna mješavina hladi do T_2 i uvjet (2) nije zadovoljen za sve sastave smjese, između točaka B i B' je dvofazno područje. Krivulje faza i slobodne energije spajaju se u kritičnoj temperaturi, T_c . Obično mješavine polimer-otapalo pokazuju gornju kritičnu temperaturu otopine ($T_1 > T_2$), dok mješavine dvaju polimera pokazuju donju kritičnu temperaturu otopine ($T_1 < T_2$).^{1,5}

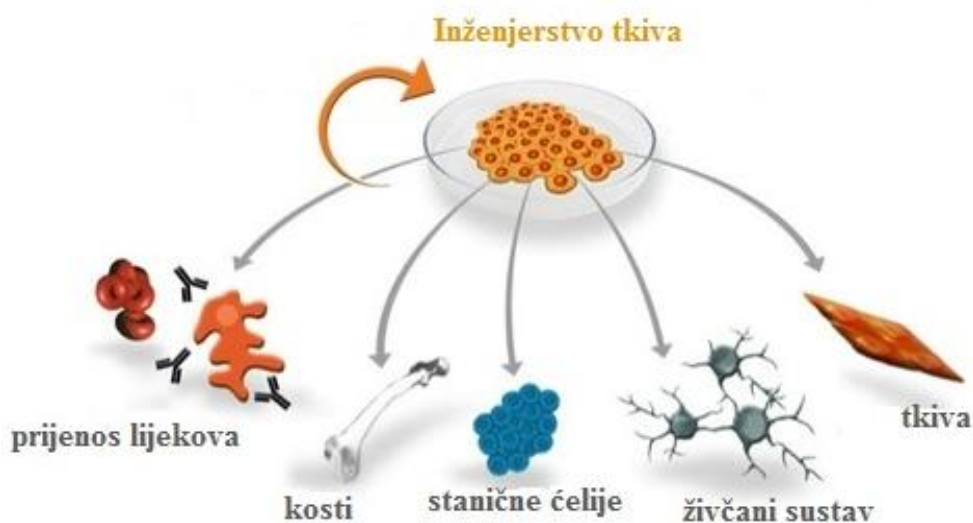
2.2. Biorazgradivi materijali

2.2.1. Biorazgradivi polimeri

Zadnjih 30-tak godina istraživanja su usmjerena na razvoj biorazgradivih materijala (implantata) jer omogućavaju ponovni rast i obnovu tkiva. Biomaterijali se mogu podijeliti prema mjestu ugradnje (ortopedske, dentalne, oftalmološke, kardiovaskularne, dermatološke itd.) i prema kemijskom sastavu na metalne, polimerne, keramičke, prirodne i kompozitne materijale.

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje koje obuhvaća znanja biologije, kemije, fizike, medicine i inženjerstva koji će u budućnosti na revolucionaran način poboljšati zdravlje i kvalitetu života osmišljavanjem i razvitkom funkcionalnih tkiva, koja će imati mogućnost obnoviti, održavati, poboljšati ili zamijeniti prirodno tkivo kod kojeg je došlo do zatajenja ili gubitka dijela tkiva. Fizička struktura biomaterijala predstavlja ključni čimbenik koji utječe na

odgovor tkiva i od njega zavisi vrsta biomedicinskih implantata. Od karakteristika materijala na mikrometarskoj i nanometarskoj razini, kao što su morfologija, difuzija, adhezija i diferencijacija *in vitro* i *in vivo*, značajno zavisi ponašanje tkiva. *In vivo* i *in vitro* metode omogućavaju dobivanje umjetnih tkiva na kontroliran način, bez potrebe stanica donora (transplantacije) i čimbenika rasta. *In vitro* ispitivanja razgradnje biopolimera u jednostavnom medijima obično se provode kako bi se predvidjela izvedba i djelovanje takvih polimera u ljudskom tijelu. Uzimajući u obzir složenost tjelesnih tekućina i uvjeta, rezultati *in vitro* i *in vivo* metoda se razlikuju. Novi materijal bi trebao oponašati strukturu i biološku funkciju zamijenjenog tkiva, te imati kemijska i mehanička svojstva kao prirodno tkivo koje se zamjenjuje, bez potrebe za ponovnim kirurškim zahvatom.⁷⁻⁹



Slika 4. Područje primjene biopolimera u medicini – inženjerstvu tkiva

Biorazgradivi polimeri mogu biti prirodni i sintetski, dok se sintetski mogu podjeliti na biorazgradive i nerazgradive. Prirodni polimeri (kitozan, hijaluronska kiselina, kolagen, svila, fibrin...) su primjenjivi u uskom području, jer su skupi, sklone su promjenama svojstava istih uzoraka, te su sklone onečišćenju s nepoznatim virusima i bakterijama. Navedeni problemi prirodnih polimera doveli su do razvoja sintetskih polimernih biomaterijala, kojima se lako kontroliraju fizikalno-kemijska svojstva i kvaliteta.¹⁰ Polimeri sintetskog porijekala pružaju veće mogućnosti „krojenja“ svojstava i ujednačenosti proizvoda. Budući da malo polimera ima zadovoljavajuća mehanička i kemijska svojstva njihova primjena u medicini je ograničena. Sintetski biorazgradivi polimeri traženih svojstava su alifatski poliesteri, a najzastupljenije funkcijske skupine su esterske, anhidridne, ortoesterske i amidne.¹¹ Polimeri nastali sintezom glikolne kiseline i drugih α -hidroksi kiseline, koji su manje zanimljivi s industrijskog stajališta zbog njihove nestabilnosti kroz dulji vremenski period, pronašli su primjenu u medicini.⁷⁻¹¹

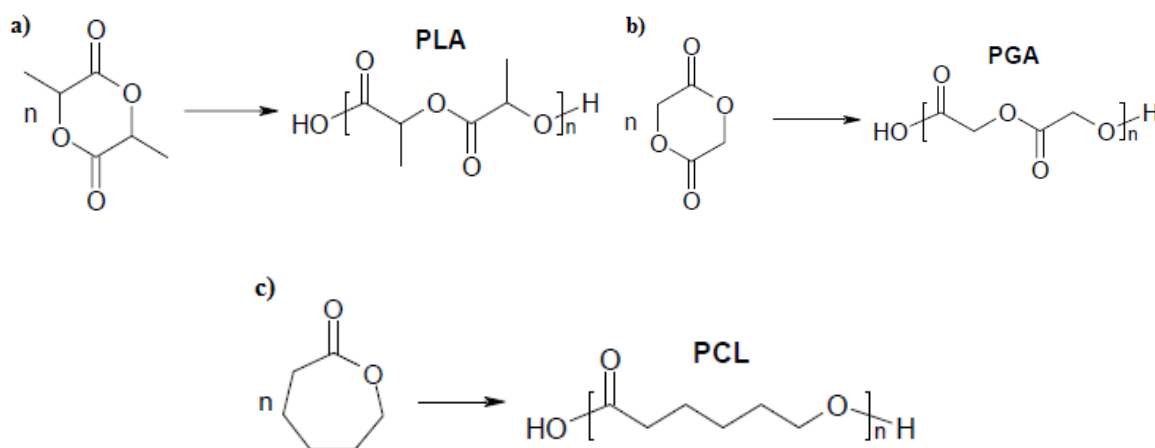
Najčešći korišteni biorazgradivi polimeri poli(α -hidroksi kiseline) su PLA (polilaktid), PGA (poliglikolid) i PCL (poli(ϵ -kapolakton)). Polilaktid (PLA) i poliglikolid (PGA) i njihovi kopolimeri su hidrofobni alifatski poliesteri na osnovi alkane kiseline. Posjeduju iznimne kvalitete, biokompatibilnost i biorazgradivost te dobra mehanička svojstva koja su ključna za primjenu u medicini (šavovi, implantati za fiksaciju kosti, prijenos molekula lijeka, matrice

za obnovu tkiva). PGA i PLA karakterizira visoka kristalnost, temperatura taljenja i niska topljivost te znatno brža razgradnja u usporedbi s PCL-om (tablica 1).^{9,10}

Tablica 1. Usporedba toplinskih, mehaničkih svojstava i svojstava razgradnje PLA, PGA i PCL¹⁰

Polimer	Toplinska i mehanička svojstva			Svojstva razgradnje
	$T_d/ ^\circ\text{C}$	$T_g/ ^\circ\text{C}$	Vlačni modul/ GPa	Vrijeme/ mjesec
PLA	173-178	60-65	1,5-2,7	12-18
PGA	225-230	35-40	5-7	3-4
PCL	59-64	-60	0,4-0,6	>24

Navedeni biopolimeri se obično sintetiziraju iz svojih cikličkih monomera putem polimerizacije otvaranja prstena (*eng. ring-opening polymerization*), slika 5.⁹



Slika 5. Prikaz polimerizacije otvaranja prstena a) PLA, b) PGA, c) PCL⁹

Biorazgradnja se opisuje kao promjena kemijskih, fizikalnih i mehaničkih svojstava u odgovarajućoj okolini, u kojoj su materijali izloženi veoma složenom djelovanju spojeva kao što su enzimi, proteini i ostali čimbenici.^{8,11} Biorazgradivi polimeri u širem smislu su oni polimeri koji se razgrađuju u biološkoj okolini: tlu, moru, vodi (rijeke, jezera), ljudskom ili životinjskom tijelu enzimskom ili neenzimskom hidrolizom. U užem smislu, biorazgradnja je razgradnja izazvana samo enzimskim djelovanjem mikroorganizama, gljivica ili bakterija.^{9,11} Biorazgradivi polimeri su materijali s mogućnošću funkcioniranja određeno vrijeme, kontroliranim mehanizmom, nakon čega slijedi razgradnja u jednostavne i netoksične produkte topljive u vodi koji se mogu izbaciti iz organizma.¹¹ Stoga se neenzimska razgradnja nekih poliesteri (npr. polilaktida) koji vrlo brzo hidroliziraju u tijelu, pri sobnoj temperaturi i neutralnom pH, svrstava u resorpiranje. Alifatski poliesteri se resorbiraju u ljudskom tijelu dajući netoksične monomere hidroksi kiseline kao produkte razgradnje.⁹

Vrlo je važno poznavati kemiju polimera i sastav kopolimera, procese sinteze, prerade i degradacije, metode karakterizacije materijala te rukovanja i uvjete čuvanja. Utjecaj svakog pojedinog parametra na razgradnju važno je dobro proučiti – kao posljedica međudjelovanja različitih čimbenika je kontinuirana promjena svojstava materijala.^{8,11}

Uvjeti koje biorazgradivi polimer mora zadovoljiti su:

- Primjerena mehanička svojstva za pojedinu namjenu
- Biokompatibilno, protuupalno, netoksično i antikancerogeno djelovanje
- Metaboličko uklanjanje iz organizama tijekom razgradnje
- Lako oblikovanje u željeni oblik
- Primjereno i prihvatljivo trajanje
- Laka sterilizacija⁸

2.2.2. Mehanizam razgradnje biopolimera

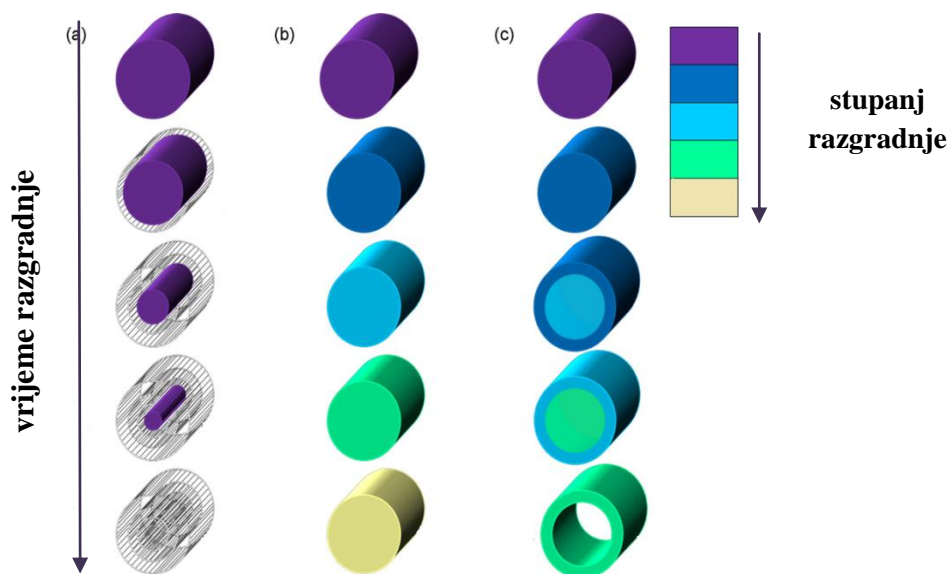
Alifatski poliesteri razgrađuju se jednim ili primjenom više mehanizama. Razgradnja polimera u okolini praktički je nepromjenjiva *in vivo*, stoga svojstva polimera određuju brzinu razgradnje. Biopolimeri izloženi tjelesnim tekućinama mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva kao rezultat kemijskih, fizikalnih, mehaničkih i bioloških interakcija između materijala i okoline te se mogu razgraditi na sljedeće načine:

- Kemijskom i enzimskom oksidacijom
- Enzimskim i/ili neenzimskom hidrolizom
- Djelovanjem mikroorganizama¹¹

Brzina razgradnje biopolimera ovisi o vrsti hidrofilnih grupa unutar i na krajevima lanca, udjelu kristalnih i amorfni područja, poroznosti, reaktivnosti hidrolitičkih grupa i molekulskoj masi polimera te veličini implantata. Uravnoteženje čimbenika koji utječu na razgradnju polimera je vrlo bitno kako bi se prilagodila brzina razgradnje polimera i prijenos naprezanja na tkivo koje se liječi. Osim svojstava materijala, mjesto i veličina implantata te pH vrijednost vodenog medija utječu na ubranu razgradnju materijala. Implanatati većih dimenzija u područjima slabije prokrvljenosti podložni su ubranoj razgradnji zbog nakupljanja kiselih produkata. Kisela okolina katalizira daljnju razgradnju implanata i smanjenje pH vrijednosti što može izazvati upalne reakcije – formiranje mikropukotina tj. povećanje površine materijala znači povećanje poroznosti i brzine hidrolitičke razgradnje implantata. Materijali za inženjerstvo tkiva moraju imati mogućnost lakog preoblikovanja i prerade zbog stvaranja poroznih struktura kroz koje se mogu odvijati biološki procesi kao u prirodnoj kosti.^{9,11}

Biorazgradnja polimera odvija se mehanizmom erozije u masi ili na površini ili mehanizmom uslijed djelovanja enzima, slika 6. Mehanizam erozije u masi temelji se na hidrolitičkoj razgradnji kemijskih veza u unutrašnjosti materijala pri čemu je brzina prodiranja vode veća od brzine kojom se polimer prevodi u vodotopljivi materijal. Kod ovog mehanizma erozija se odvija po presjeku polimera i karakteristična je sustave koje sadrže polilaktid

(sintetski komercijalni implantati, konci). Veličina polimerne matrice ostaje stalna čak i u kasnijim stupnjevima razgradnje, no mikrostruktura unutar matrice polimera se značajno mijenja. U slučaju nasumične razgradnje u unutrašnjosti, oligomeri i krajnje karboksilne skupine ne mogu slobodno difundirati iz mase materijala već dolazi do katalizirane erozije u masi. Brzina razgradnje polimera u unutrašnjosti je veća u odnosu na površinu uslijed nakupljanja kiselih produkata. Drugi mehanizam razgradnje polimera je površinska erozija kod koje dolazi do gubitka mase na površini – materijal se stanjuje uz zadržavanje izvorne geometrije. Kod ovog mehanizma brzina prodiranja vode se odvija sporije od erozije polimerene osnove (matrice). Kod idealne površinske erozije, brzina erozije je direktno proporcionalna promjeni površine matrice polimera. Polianhidridi i poliortoesteri su podložni površinskoj eroziji kao mehanizmu razgradnje. Enzimima katalizirana razgradnja polimera, može slijediti mehanizme erozije posebice za hidrofobne i kristalične homopolimere. Razgradnja polimera se odvija na enzim-polimer međupovršini zbog nemogućnosti prodiranja enzima u unutrašnjost strukture polimera.¹¹ Provedena i potpuno je opisana *in vivo* enzimska razgradnja poliuretana (PU) za primjenu u biomedicini. Osim inženjerstva tkiva polianhidridi i poli(eter-uretani) pokazali su potencijalnu primjenu u sredstvima za kontroliranu isporuku lijekova, točnije kemoterapijskih sredstva, lokalnih anestetika, antikoagulanasa i neuroaktivnih lijekova.^{8,10}



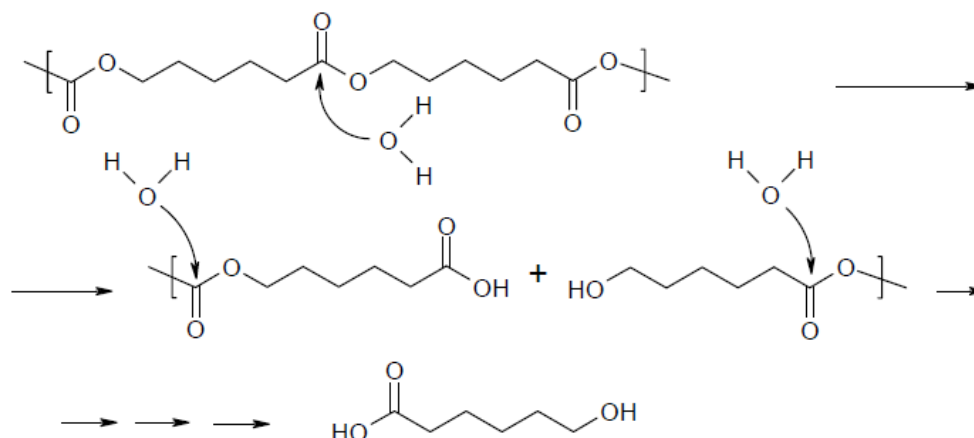
Slika 6. Shematski prikaz mehanizma: a) površinske erozije, b) erozije u masi, c) autokatalizirana erozija u masi

Mehanizam razgradnje polimera rezultat je više faktora, uključujući:

- Kemijsku stabilnost polimera
- Kristalnost
- Aditive i nečistoće
- Geometriju uzorka
- Medij u kojem se polimer nalazi ¹¹

2.2.2.1. Hidrolitička razgradnja PCL-a

Razgradnja alifatskog biopolimera poli(ϵ -kaprolaktona) je proces koji se odvija u dva stupnja mehanizmom hidrolize, prikazan je na slici 7.



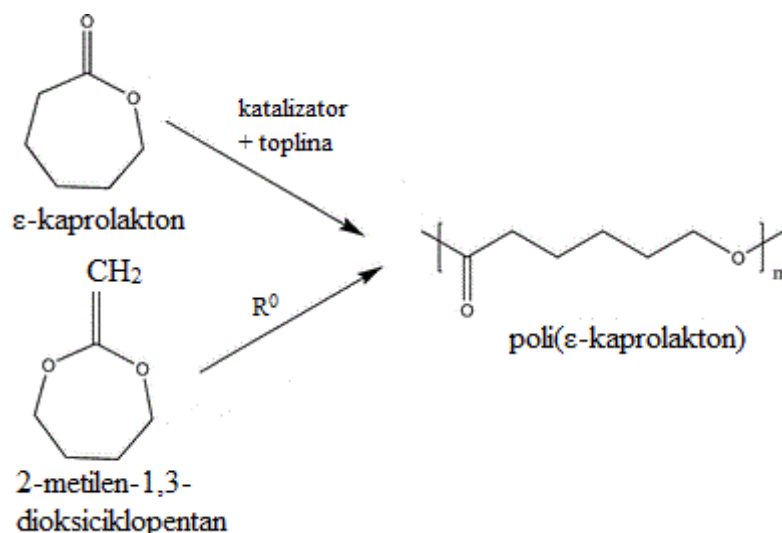
Slika 7. Shematski prikaz hidrolize PCL polimera ⁹

U prvom stupnju molekule vode prodiru u masu materijala pri čemu nasumično djeluju na kemijske (esterske) vežglavnog polimernog lanca u amorfnim područjima, dok kristalni dijelovi materijala podupiru polimernu matricu. Brzina reakcije je usko povezana sa sposobnošću polimera da apsorbira vodu, pri čemu hidrofilni polimeri upijaju veliku količinu vode i razlažu brže od hidrofobnih matrica. Dugi polimerni lanci prevode se u kraće oligomere, monomere i molekule manjih molekulskih masa koje su topljive u vodi. Tijekom procesa razgradnje polimera dolazi do promjena samih svojstava polimera, a najvažniji parametar je molekulska masa. U ovoj fazi dolazi do smanjenja molekulske mase, no bez utjecaja na fizikalna svojstva materijala. Drugi stupanj razgradnje uključuje hidrolizu kristalnih područja. Cijepanjem lanca nastaju krajnje karboksilne skupine koje kataliziraju razgradnju PCL-a, pa možemo reći da PCL autokatalizira hidrolizu. Uslijed metaboličke razgradnje fragmenata tj. difuzije oligomernih jedinica iz mase materijala dolazi do brzog gubitka mase.^{9,11}

2.2.3. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) linearni alifatski poliester. Sintetski je polimer čija se molekularna struktura sastoji se od pet nepolarnih metilenskih skupina (-CH₂-) i jedne esterske skupine povezanih u lanac, pri čemu je esterska skupina relativno polarna. Kristaliničan je polimer sporog stupnja razgradnje i temperature taljenja (T_m) između 59 – 64 °C ovisno o stupnju kristalnosti. Temperatura staklastog prijelaza ili staklišta (T_g) nalazi se ispod sobne temperature, na -60 °C Temperatura degradacije (T_d) PCL-a iznosi 350 °C, dok su drugi poliesteri razgradivi na nižim temperaturama (235 – 255 °C), što ukazuje na relativno visoku toplinsku stabilnost PCL-a.¹¹ 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 vodi, alkoholu, petroleju i dietil-eteru.^{10,12}

Poli(ϵ -kaprolakton) moguća je sintetizirati na dva načina. Prvi način naziva se polimerizacija otvaranjem prstena (ROP) (*eng. ring-opening polymerization*), slika 8. Pri ovoj polimerizaciji dolazi do otvaranja prstena monomera pri čemu nastaje monomerna jedinica koja sadrži manje prstenova nego ciklički monomer ili nije prstenaste strukture. Mehanizam otvaranja prstena ϵ -kaprolaktona provodi se koristeći anionske, kationske ili koordinacijske katalizatore, a nakon otvaranja slijedi polimerizacija.⁹ Radikalna polimerizacija je lančana polimerizacija te drugi način dobivanja PCL-a. Otvaranje prstena 2-metilen-1,3-dioksiciklopentana (etilen keten acetala) potaknuto je djelovanjem slobodnih radikala (aktivni centri) nakon čega slijedi polimerizacija.¹³



Slika 8. Sinteza poli(ϵ -kaprolaktona) metodom otvaranja prstena i metodom radikalne polimerizacije 2-metilen-1,3-dioksiciklopentana¹⁴

2.2.4. Primjena PCL-a u medicini

Poli(ϵ -kaprolaktona) ima izuzetno dobra fizikalna i biološka svojstva, te potencijalnu primjenu u medicini. Molekulna masa poli(ϵ -kaprolaktona) je u rasponu od 3 000 do 80 000 g/mol, s time se mijenjaju i svojstva materijala. PCL pri visokim molekulnim masama pokazuje odlična mehanička svojstva, ali sporiju razgradnju. Što je veća molekularna masa to su mehanička svojstva materijala bolja.^{7,14}

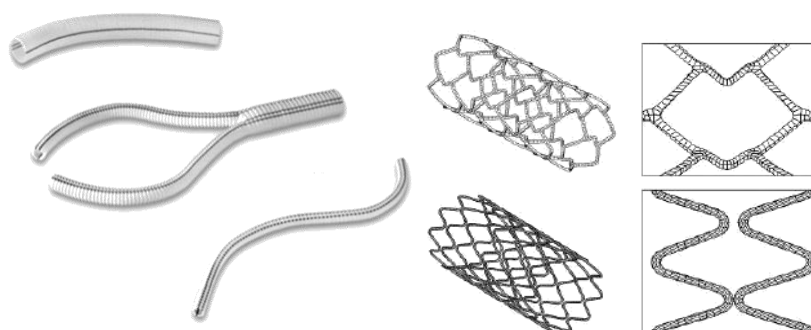
Brzina razgradnje homopolimera PCL ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući stupanj kristalnosti, molekularnu masu, morfologiju i uvjete u kojima se nalazi, kao što su temperatura i pH. Razgradnja polimera moguća je u prisutnosti enzima, bakterijskih i gljivičnih sojeva. Također, polimer je podložan hidrolitičkom mehanizmu razgradnje. Karakteristika PCL-a i njegovih kopolimera je hidrolitička nestabilnost zbog osjetljivosti prisutnih alifatskih esterskih veza na hidrolizu. Budući da se kristalna područja razgrađuju sporije od amorfni dijelova semikristalnog polimera, PCL se kombinira s drugim biorazgradivim polimerima. Kombinacijom PCL-a i drugih polimera utječe se na kinetiku razgradnje i hidrofobnost.¹⁰

U biomedicini se sve se više istražuje primjena sintetskog biopolimera PCL-a, a primjena je široko orijentirana od inženjerstva tkiva (*eng. tissue engineering*), kardiovaskularnog inženjerstva (*eng. cardiovascular tissue engineering*) sve do obnove živaca.¹⁴

PCL je biokompatibilan i biorazgradiv polimer koji se koristi za: prekrivanje rana (umjetna koža), obnovu tkiva (tetiva i ligamenata, srčanih i krvnih žila, živaca), zatvaranje rana (šavovi, kirurške spojnice), za izradu stomatoloških implantata, za učvršćivanje kostiju nakon loma (vijci, pločice, čavlići).¹⁴ Osim navedenih biomedicinskih aplikacija istražena je i primjena navedenog polimera kao sredstva za kontrolirani prijenos (isporuku) molekula lijeka, proteina, gena. Polimerna kapsula se smješta u neposrednoj blizini ciljanog mjesta, te kako se polimerna kapsula razgrađuje tako se lijek oslobađa.^{8,9,14}



Slika 9. Prikaz različitih implantata: vijaka, čavlića, rekonstrukcijskog vijakai pločica, dentalnih implantata¹⁵



Slika 10. Prikaz srčanih implantata, kanala i stentova¹⁵

2.3. Enzimi

Enzim potječe od grčke riječi *ένζυμο* – zakiseliti. Enzimi su biokatalizatori čije djelovanje omogućuje odvijanje kemijskih procesa u organizmu. Više od 40000 različitih enzima je u ljudskim stanicama te svaki kontrolira drugu kemijsku reakciju. 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. Enzimi ne utječu na smjer kemijske reakcije, već ubrzavaju uspostavljanje ravnoteže. Svaka enzimska reakcija započinje reverzibilnim vezanjem supstrata. Kao posljedica veličine enzima, steričke konformacije i raspodjele naboja u katalitičkom središtu enzima, enzimi pokazuju selektivnost prema vezanju određenih molekula. Enzimi su i stereospecifični jer kataliziraju reakcije samo jednog od dva moguća enantiomera.^{16,17}

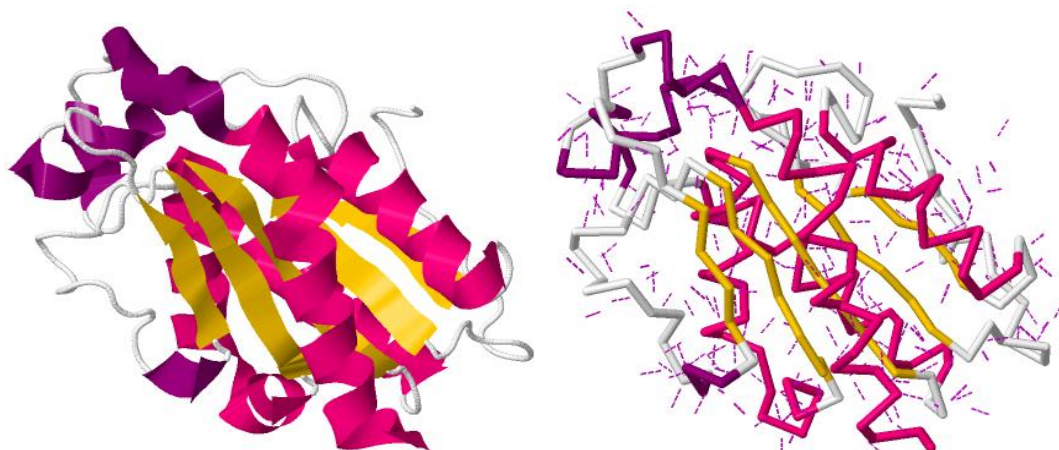
Podjela enzima

Prema vrsti katalitičke reakcije razlikuje se šest glavnih skupina enzima, dok unutar glavnih skupina podjela se provodi prema kemijskim vezama koje nastaju ili se cijepaju. Šest glavnih skupina enzima su:

- Oksidoreduktoze
- Transferaze
- Hidrolaze
- Liaze
- Izomeraze
- Ligaze¹⁶

2.3.1. Struktura enzima

Enzimi su najčešće globularni proteini relativne molekulske mase od 10 000 do 100 000, dok oni izgrađeni od oligomera mogu imati i znatno veće molekulske mase. Većinu enzima čini proteinski dio i pripadajuća „prostetska grupa“. Ukolika se takava grupa veže reverzibilno u svojoj aktivnoj formi, enzim se naziva apoenzimom, a koenzimom „prostetska grupa“. Nekim enzimima su potrebne molekule koje bi pomogle pri njegovom aktiviranju – kofaktori. Kofaktori mogu biti anorganskog porijekla (npr. ioni metala) ili organskog porijekla (koenzimi). Enzim koji je povezan sa svojim kofaktorom i predstavlja aktivni oblik enzima zove se holoenzim. Osim proteinskog dijela, enzimi mogu sadržavati i razne neproteinske molekule ili ione metala (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}) koji izravno sudjeluju u vezanju supstrata ili u katalizi.^{16,17}

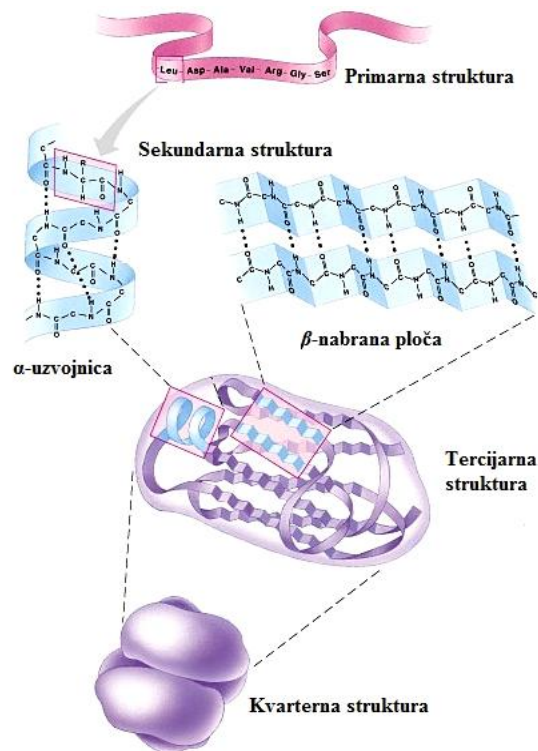


Slika 11. Trodimenzionalni prikaz molekule kutinaze (skupina hidrolaza) ¹⁸

Polipeptidni lanac enzima sastoji se od niza povezanih L- α -aminokiselina. Primarnu strukturu polipeptidnog lanca enzima čini linearni slijed aminokiselina. 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. Redoslijed aminokiselina uvjetuje vrstu nabiranja, pa razlikujemo strukture α -uzvojnice (eng. *α -Helix*) i β -nabrane ploče (eng. *β -Sheet*). U α -uzvojnici uspostavljaju se intramolekularne vodikove veze između karbonilne skupine i protona –NH skupine druge peptidne veze, te peptidni lanac poprima oblik spirale (uzvojnice). Kod β -nabrane ploče uspostavljaju se intermolekularne vodikove veze između karbonilne skupine i protona –NH skupine druge peptidne veze, a lanci su povezani u izduženoj konformaciji. Dva lanca mogu biti paralelna ili antiparalelna ovisno da li je orijentacija lanca ista ili suprotna (N-kraj do C-kraj). Anti-paralelne β -nabrane ploče su stabilnije zbog većeg broja dobro usklađenih vodikovih veza. Navedene sekundarne strukture proteina povezuju se s petljama, okretima, vrpčama i drugim izduženim konformacijskim oblicima. Raspored sekundarnih struktura u prostoru određen je međusobnim djelovanjem između bočnih aminokiselinskih ostataka.

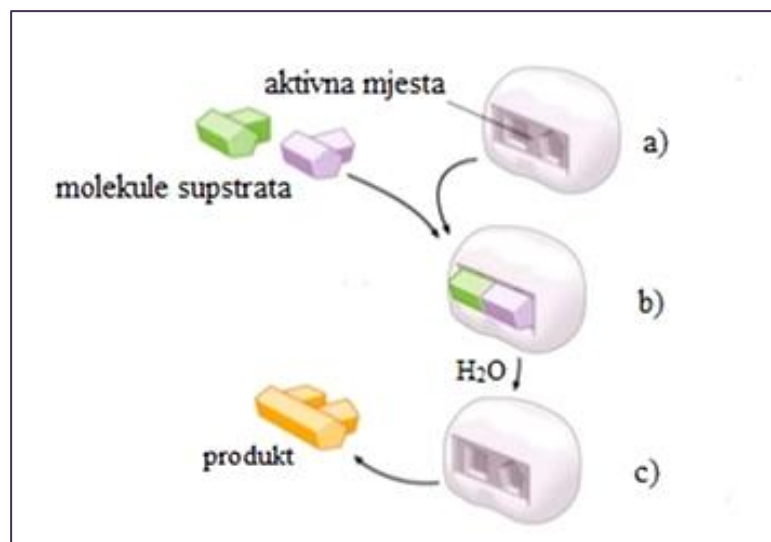
Međusobni raspored sekundarnih struktura u prostoru određuje terciarnu strukturu polipeptidnog lanca. Ukupni trodimenzionalni oblik cijele molekule proteina je terciarna struktura lanca. Molekula proteina želi potići maksimalnu stabilnost ili najniže energetske stanje, što postiže savijanjem i uvijanjem. Kvantarna struktura polipeptidnog lanca odnosi se na formiranje većeg agregiranog proteinskog kompleksa. Takav kompleks nastaje međusobnom interakcijom jedne proteinske podjedinice s drugom, dok se konačna struktura proteina stabilizira različitim interakcijama, uključujući i veze. Cijeli proces nastajanja svake pojedine strukture polipeptida je prikazan na slici 12. ¹⁶⁻¹⁹



Slika 12. Moguće strukture proteina ili polipeptida ¹⁹

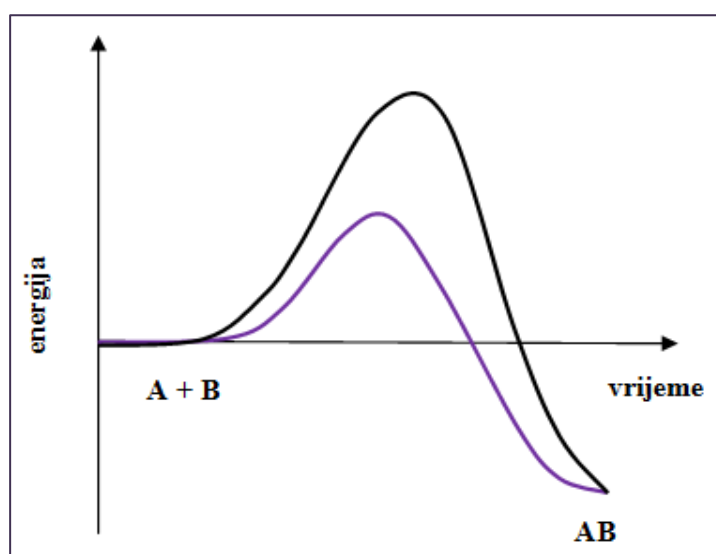
2.3.2. Aktivno mjesto

Multienzimski kompleksi – složene visoko uređene strukture koje nastaju povezivanjem raznih enzimskih proteina predstavljaju mjesta važnih regulacijskih procesa. Kao što je navedeno, mnogostruko nabrani polipeptidni lanc stvara razgranati molekulski skelet koji je važan za stabilizaciju aktivnog središta. Aktivno mjesto je samo mali dio ukupne enzimske molekule i obično je smješteno je u procjepu ili udubljenju trodimenzionalne strukture enzima. Struktura aktivnog mjesta nije kruta, već fleksibilna time i cijeli mehanizam katalize. Dakle, katalitička reakcija na enzimima odvija se u katalitički aktivnom mjestu enzima. Katalitički aktivno mjesto enzima sastoji se od nekoliko aminokiselinskih ostataka čije reaktivne skupine obuhvaćaju supstrat s nekoliko strana. Zbog međumolekulskih djelovanja između enzima i supstrata dolazi do vezanja supstrata s enzimom, nekovalentnim i više puta kovalentnim vezama, u enzim-supstrat kompleks, a prilikom toga dolazi do konformacijskih promjena enzima i supstrata. Nastankom enzim-supstrat kompleksa katalitički aktivno središte enzima poprima komplementarnu strukturu prema strukturi prijelaznog stanja molekule supstrata. Time se znatno smanjuje energija aktivacije reakcije, što uvjetuje povećanje brzine reakcije vezanih supstrata. Brzina reakcije može se povećati za nekoliko redova veličine, a ograničena je difuzijom molekula koje su u reakcijskoj sredini.^{16,17}



Slika 13. Djelovanje enzima (princip „ključ – brava“) započinje vezanjem supstrata za aktivna mjesta molekule enzima a), pri čemu nastaje enzim-supstrat kompleks b), oblikovanjem enzima i supstrata nastaje enzim-produkt kompleks te produkti napuštaju aktivna mjesta enzima c), te se ciklički proces nastavlja ²⁰

Reakcije na koje utječe enzim moraju se odvijati spontano – vrijednost Gibbsove slobodne energijemora biti negativna. Uloga enzima je povećanje brzine reakcije što je prikazano na slici 14. Bez prisutstva enzima reakcije se kreću u istom pravcu kao i s enzimom, ali mnogo manjom brzinom. Enzimi mogu utjecati na više reakcija istovremeno, tako da ona reakcija koja je s termodinamičke točke gledišta najpovoljnija (veća je vjerovatnost njena ostavrenja), može „povući“ termodinamički nepovoljniju reakciju, i na taj način se mogu ostvariti obje reakcije. ^{16,17}



Slika 14. Prikaz ovisnosti energije aktivacije o vremenu tijekom kemijske reakcije ($A + B \rightarrow AB$) bez (crna krivulja) i sa enzimom (ljubičasta krivulja) ¹⁶

Čimbenici koji utječu na enzimsku reakciju^{1,16,17}

■ Temperatura

Enzimi imaju optimalnu temperaturu pri kojoj djeluju najbrže. Brzina djelovanja enzima povećava se s temperaturom budući da molekule enzima i supstrata imaju veću kinetičku energiju te se češće sudaraju. Također, brzina reakcije raste jer molekule imaju dovoljno energije da prijeđu aktivacijsku barijeru. Iznad optimalne temperature brzina se smanjuje. Djelovanjem toplinske energije vodikove veze koje drže sekundarne i tercijarne strukture enzima zajedno pucaju. Time enzim gubi svoj oblik i supstrat više ne odgovara aktivnom središtu.

■ pH

Većina enzima imaju optimalnu vrijednost pH između 7 i 8. Pri toj pH vrijednosti enzimi djeluju najbrže, dok neki enzimi kao što je pepsin imaju optimalan pH 1.

■ Koncentracija supstrata i/ili enzima

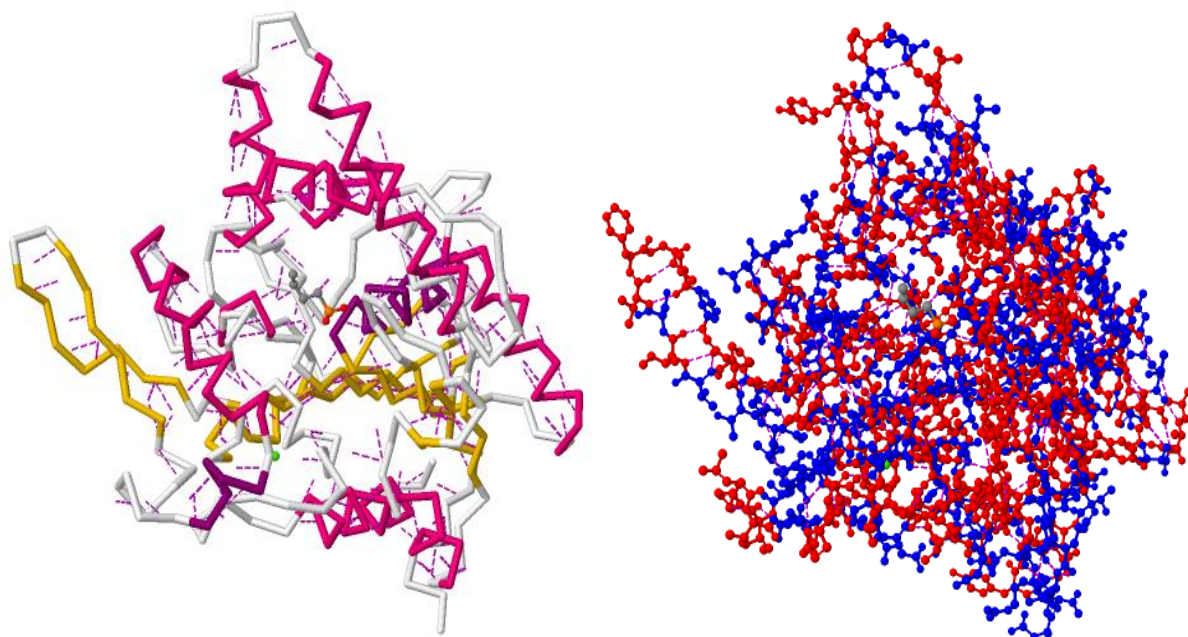
Brzina djelovanja enzima također ovisi o koncentraciji supstrata. Povećanjem koncentracije supstrata brzina reakcije raste jer veći broj molekula supstrata može tvoriti enzim-supstrat kompleks. Na višim koncentracija molekule enzima su zasićene molekulama supstrata te je sve manje slobodnih aktivnih mjesta – koncentracija supstrata nakon točke zasićenja je konstanta.

2.3.3. Lipaza

Lipaza je enzim koji pripada skupini hidrolaza i podskupini serin esteraza, katalizira reakciju hidrolize masti i ulja (karboksilne esterske veze), pri čemu se hidroliza provodi postupno, a produkti razgradnje su diacilglicerol i monoacilglicerol, glicerol i slobodne masne kiseline.²¹ Lipaze imaju važnu ulogu u metabolizmu lipida zbog čega su vrlo rasprostranjene te mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobiološkog porijekla. Trenutno, najveći biotehnološki značaj imaju lipaze mikrobiološkog porijekla jer se ostvaruju veći prinosi enzima, moguća je genetička promjena proizvedenog mikroorganizma i njihov brzi rast na jeftinim hranljivim podlogama. Lipaze koje se dobivaju iz kvasca i gljivica najviše koriste zbog pristupačnosti su: *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus fumigatus*, *Thermomyces lanuginosa* i *Rhizomucor miehei*.²¹⁻²³

Prostorna struktura lipaze sastoji se od središnje α -uzvojnice i osam paralelnih β -nabranih ploča, uzimajući β_2 -nabrane ploče koja je antiparalelna u odnosu na druge. Najčešća i najočuvanija struktura $\alpha\beta$ hidrolaza je „nukleofilni lakat“ (eng. *nucleophilic elbow*). Kod ove strukture nukleofilni ostaci između α -uzvojnice i β -nabrane ploče su jako zakrenuti, a aktivna mjesta su u najpovoljnijem položaju. $\alpha\beta$ protein ima katalitički aktivan serin koji se nalazi u oktetu koji spaja C-terminalni kraj α -uzvojnice i α -uzvojnica.²¹ Broj aminokislinskih ostataka je u širokom rasponu od 270 do 630. Na osnovi sekundarne i tercijarne strukture utvrđeno je da

se aktivno mjesto enzima nalazi u unutrašnjosti molekule i zaklonjeno je peptidnim lancem. Aktivno mjesto većine lipaza čine ostaci tri hidrofobne aminokiseline (trijade): serina (Ser 152), asparagina (Asp 176) ili glutamina i histidina (His 263). Ovisno o porijeklu lipaze, razlikovati će se položaj tri aminokislinska ostatka u primarnoj strukturi enzima, a katalitički aktivno mjesto ispod petlje ima ulogu vezanja supstrata. Za histidin vodikovom vezom vezan je serin i karboksilna skupina asparagina ili glutamina što omogućava ostacima serina da napadnu karboksilnu skupnu molekula supstrata.^{16, 17, 21}



Slika 15. Trodimenzionalni prikaz *Pseudomonas cepacia* lipase; prikaz hidrofobnih/hidrofilnih veza enzima (lijevo)²³

Poznavanje strukture, mehanizma djelovanja i kinetike omogućava oblikovanje i strukturiranje lipaze u brojne svrhe. U ljudskome tijelu lipaza se primarno proizvodi u organu gušterači, ali ima je i u usnoj šupljini i želucu. Enzim lipaze pripada skupini enzima probave koji omogućavaju razgradnju unesene hrane i prijenos njezinih hranjivih sastojaka putem krvi do svih stanica organizma. Osim važne uloge u kontroli pohranjenih triglicerida u masnom tkivu, indirektna aktivacije inzulina i inhibicije adrenalina u ljudskom tijelu, vrlo je važna i u kemiji i inženjerstvu.^{17,21} Lipaza može djelovati u blagim uvjetima, pokazuje toplinsku postojanost i stabilnost u organskim otapalima te veliku selektivnost što čini njezinu svestranost kao jedne od najčešće korištenih grupa biokatalizatora u brojnim biotehnološkim procesima. Selektivnost je važna osobina lipaza na kojoj se zasniva njihova primjena, jer pravilnim izborom lipaze moguće je usmjereno odvijanje reakcije i dobivanje čistog proizvoda u velikim količinama. Lipaze imaju više vrsta specifičnosti: specifičnost u odnosu na ester, specifičnost u odnosu na masne kiseline, stereokemijsku i pozicijsku specifičnost. Lipaze imaju veliku ulogu u prehrambenoj industriji, industriji masti i ulja, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji. Imaju sposobnost katalize sintetskih reakcija (esterifikacija, transesterifikacija), te se koriste za pripravu optički aktivnih međuprodukata u farmaciji i proizvodnji finih kemikalija. Zbog svojstva selektivnosti i mogućnosti razdvajanja dva optički aktivna enanrinomera u

ekvimolarnoj količini (enzim djeluje samo na dva stereokemijska oblika supstrata), sve se više upotrebljava pri proizvodnji lijekova.²¹

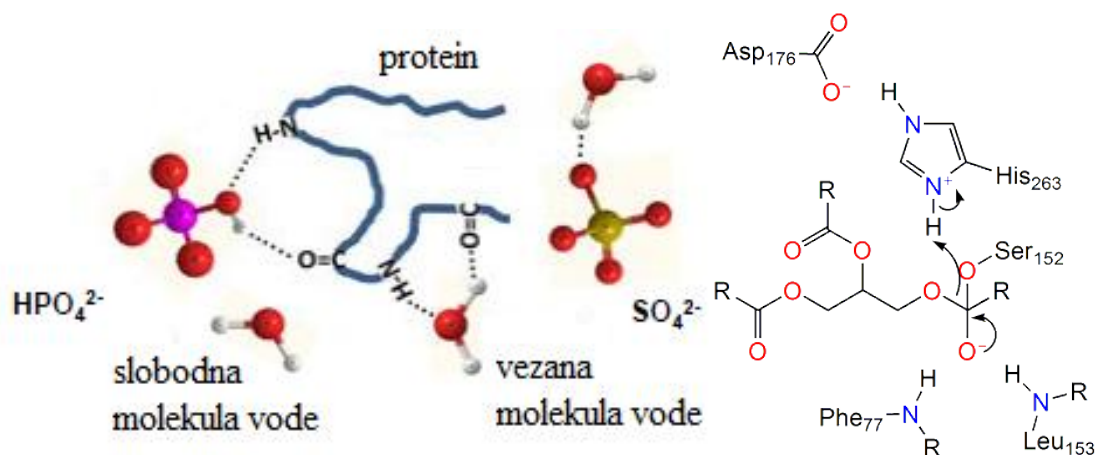
2.3.3.1. Enzimska razgradnja PCL-a

Enzim lipaza ima sposobnost ubrzanja hidrolize esterskih veza kod poliestera, pa i poli(ϵ -kapolaktona), što su potvrdila i istraživanja.²³ 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 vezamasnih kiselina s kratkim lancima, ne duljim od šest ugljikovih atoma. U usporedbi s lipazom, enzimi esteraze i savinaze dovode samo do smanjenja mase bez značajnog djelovanja na razgradnju polimera što potvrđuju konstante brzine reakcije. Konstanta brzine reakcije enzima lipaze na PCL je oko 10 puta veća u odnosu na konstantu brzine reakcije esteraze i savinaze, što ukazuje na visoki omjer razgradnje.²⁴

Enzimska razgradnja poli(ϵ -kapolaktona) ovisi o hidrofilnosti, kod hidrolitička razgradnja ovisi i o stupnju kristalnosti. Dakle, enzimska razgradnja PCL-a odvija u dva stupnja na površini polimera jer hidrofilni enzim teško difundira u unutrašnjost polimera.^{24,25} U prvom stupnju razgradnje hidroksilna skupina serina napada karbonilnu grupu supstrata, formira se acilo-enzimski kompleks uslijed čega se oslobađa molekula alkohola. Djelovanjem nukleofilne grupe, dolazi do hidrolize kompleksa što čini drugi stupanj razgradnje. U vodenim otopinama nukleofilna grupa je hidroksilna grupa iz molekula vode, pa kao proizvod nastaje masna kiselina. Naime, aktivni centar lipaze se nalazi unutrašnjosti molekula, pa takav položaj onemogućava molekulama supstrata vezanje za enzim što znači da su lipaze uglavnom neaktivne u vodenim otopinama. Djelovanje lipaza određeno je međupovršinskom aktivacijom – međudjelovanjem lipaza s nepolarnom površinom triglicerida na međupovršini trigliceridi/voda znatno se povećava aktivnost lipaza. Dakle, aktivnost lipaza je neznatna ispod kritične micelarne koncentracije, a znatno se povećava iznad kritične micelarne koncentracije. Međutim, kada se lipaza adsorbira na graničnoj površini između vodene i nepolarne faze, dolazi do promjene prostornog rasporeda molekula zbog pomicanja hidrofobnih dijelova peptidnog lanca ka nepolarnoj fazi. Molekula lipaze zauzima tzv. „otvorenu konformaciju“ pri kojoj je aktivni centar dostupan molekulama supstrata i omogućava se stvaranje kompleksa enzim-supstrat.^{17,21}

Ubrzana razgradnja polimera postiže se upotrebom kiselog ili baznog medija koji poboljšava hidrolizu esterskih veza, te se time ujedno oponašaju fiziološki uvjeti.²⁵ Brzina djelovanja enzima u organskom mediju je nekoliko redova veličina niža od onih u vodenoj otopini zbog ograničene pristupačnosti supstrata, strukturnih promjena i smanjene fleksibilnosti proteina.²⁵ S ciljem povećanja aktivnosti enzima u organskim medijima koriste se organski puferi, anorganske soli, površinski aktivne tvari. Fosfatni pufer i natrijev sulfat značajno povećavaju katalitičku aktivnost lipaze zbog prisutnosti vode koja okružuje polimer. Ukoliko je niska koncentracija pufera, količina vode nije dovoljna za aktivaciju enzima u potpunosti. Lipaza je vrlo aktivan enzim koji pokazuje polarnu prirodu, što bi značilo da puferirane otopine soli povećavaju polarnost enzimskog pripravka i aktivaciju enzima do određene granice.^{26,27} Također, istraživanja su pokazala da pri nižim temperaturama promjena mase se pripisuje

uklanjanju adsorbirane vode, dok pri višim temperaturama je rezultat uklanjanja vezane vode za enzim (protein) i disocijacije kvarterne strukture enzima. Djelomično adsorbirana voda utječe na fleksibilnost enzima, dok vezana voda sudjeluje u izgradnji kvarterne strukture proteina, koja je neophodna za katalitički aktivne konformacije.²⁶



Slika 16. Shematski prikaz interakcija *Pseudomonas cepacia* lipase i organskog medija NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, Na₂SO₄(lijevo) i građa trijade proteina lipaze (desno)²⁶

2.4. Pčelinji vosak (BW)

Pčele sakupljaju nektar iz cvjetova i donose ga u košnicu gdje postaje ili pčelinji vosak ili med. Nektar koji pčele skupljaju iz cvijeća glavni je izvor ugljikohidrata koje pčele pretvaraju u lako probavljivi šećer - glukozu i fruktozu, koji je glavni sastojak meda. Zreli med ne sadrži više od 15% vode, a pčele ga u saću pokrivaju voštanim poklopcima i tako čuvaju od upijanja vlage i kvarenja. U medu se nalaze minerali, aminokiseline, visoko vrijedne organske kiseline kao što su mravlja, jabučna, limunska, octena, jantarna kiselina, pigmenti, razni derivati klorofila, vosak, inulin te elementi kompleksa vitamina B.^{28,29}



Slika 17. Pčelinji proizvodi (lijevo); prikaz meda i saća (desno)³⁰

Usporedno sa razvojem pčelinje zajednice u proljeće i ljeto u njima se povećava broj mladih pčela koje su zauzete hranjenjem, odgojem mladih pčela i preradom nektara u med. Izvršavajući sve te zadatke mlade pčele pojačano se hrane nektrom i peludi, što utječe na razvoj njihovih voštanih žlijezda i one počinju izlučivati vosak, kojim grade saće ne samo u plodištu već svugdje gdje za to ima mjesta. Ukoliko je broj pčela i legla veći, vrijeme toplije, a dotok nektara i peludi u košnicu je redovit i stalan, u toliko pčele luče više voska. Obrnuto, kada su zajednice slabe, prinosi loši i vremenske prilike nepovoljne, proizvodnja meda i voska bit će slaba ili je uopće neće biti.^{28,30}

Pčele radilice koji žive samo oko 35 dana u ljeti i sposobne su razviti posebne žlijezde za proizvodnju voštanih ljestvica na svojem zadku. Pčelinji vosak je proizvod žlijezda mladih pčela od tri do osamnaest dana starosti. Najučinkovitija proizvodnja voska je od desetog do šesnaestog dana njihova života.^{28,29} Proces prenošenja voštane ljestvice može biti na dva načina. Budući da je većina aktivnosti u košnici jako dobro organizirana druge pčele uklanjaju voskovne ljestvice pčela radilica. Nakon što druge pčele uklone listiće voska one ih prerađuju, točnije žvaču i iskorištavaju u gradnji saća. Pčela radilica pomoću stražnje noge prenosi vosak na prednje noge te u čeljust što je drugi način uklanjanja voštanih ljestvica. U čeljusti pčele radilice vosak se prerađuje i zatim primjenjuje za gradnju ili popravak saća. Koliko će pčele lučiti voska, koliko će izgraditi saća, ovisi od tri čimbenika: prvo, od unosa nektara i peludi; drugo, od potrebe za saćem, slobodnog prostora, i treće, od broja mladih pčela u pčelinjoj zajednici. Prema mnogim istraživanjima, lučenje voska direktno je uvezi sa količinom hrane koja se unosi u košnicu i prostora koji mora biti u neposrednoj blizini zajednice.²⁹ Pri proizvodnji voska utrošak energije kod pčela izuzetno je velik, tako da za 1 kg voska utroše čak 8 kg meda.³¹

Pčelinje zajednice moraju imati saće za potrebe mladih pčela i spremanje meda, polena i peludi, ali i prostor za gradnju novog saća. Za potrebe mladih pčela se stvaraju idealne šesterokutne ćelije, koje se prije nego pčela matica u njih položi jaja poliraju propolisom. Saće je skup šesterokutnih (heksagonalnih) stanica ili ćelija koje su pravilno poredane jedna do druge, tako da između njih nema praznog prostora. Takav način gradnje, odnosno oblik stanice omogućava pčelama maksimalno iskorištavanje prostora i skladištenje hrane.³²



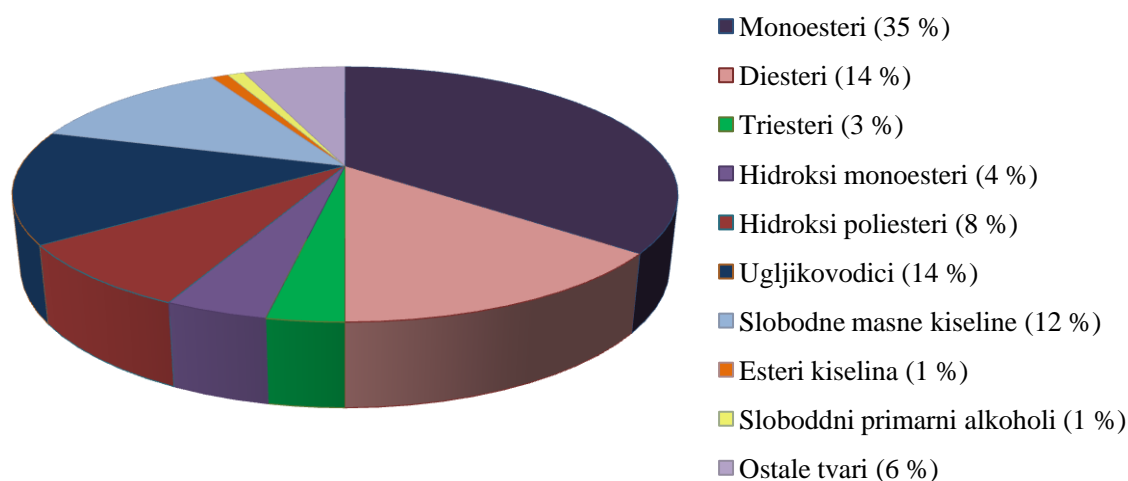
Slika 18. Prikaz pčelinjeg saća (lijevo)²⁸; pčelinji vosak (desno)³⁰

Pčelinji vosak je inertni materijal koji ima miris meda ili meda i propolisa. U presjeku je sitno zrnate krhke strukture temperature taljenja između 61 °C i 65 °C te specifične težine oko

0,95 pri 15 °C. Kristalnost voska počinje opadati nakon 3-4 mjeseca, dok istovremeno tvrdoća i elastičnost rastu. Iako je netopljiv u vodi, pčelinji vosak može se otopiti u otapalu kao što je tetraklormetan, benzen, toluen, kloroform i topli eter. Međutim, na sobnoj temperaturi pčelinji vosak nije u potpunosti topljiv u svim navedenim otapalima, već se nakon postizanja temperature taljenja potpuno i lako se otopi.²⁸ Prirodna boja pčelinjeg voska je bijela, a u dodiru sa zrakom postaje žute boje kakav nam je i više poznat. Sama boja pčelinjeg voska ovisi i o podneblju odnosno omjeru tvari u vosku – propolisa i peludi.^{28,30,31}

Najmanje 300 različitih komponenata čine pčelinji vosak čiji je približni sastav $C_{15}H_{31}COOC_{30}H_{61}$, što dokazuje njegovu iznimnu kompleksnost. Pčelinji vosak se uglavnom sastoji od linearnih monoestera, hidroksi monoestera i slobodnih masnih kiselina koji čine 35-45 % ukupne mase voska, duljine lanca od 40 do 48 atoma ugljika. Osnovu voska čine ugljikovodici (12-16 %) s neparnim brojem ugljikovih atoma, obično od 27 do 33. Točan sastav pčelinjeg voska ovisi o vrsti pčele, geografskim i klimatskim uvjetima, izvoru hrane, veličini zajednice, približan kemijski sastav dan je u tablici 2.^{28,30,31}

Tablica 2. Približan kemijski sastav pčelinjeg voska²⁸

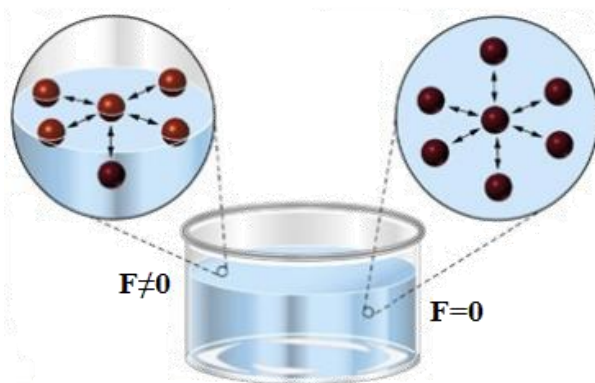


2.5. Površinski fenomeni

2.5.1. Slobodna površinska energija

Površina je područje između kondenzirane faze (S ili L) i plinovite faze, dok je međupovršinapodručje između dviju kondenziranih faza. Kada kapljevina dodirne krutinu, površinska svojstva kapljevine i krutine određuju jakost međudjelovanja kruto-kapljevito. Stoga, nehomogena raspodjela atoma na površini tvari uzrokuje fenomen koji se naziva napetost površine i predstavlja direktnu mjeru međumolekulskih sila. U unutrašnjosti faze molekula je okružena drugim molekulama i ona se nalazi u stanju dinamičke ravnoteže, dakle rezultanta sila u unutrašnjosti je jednaka 0. Na molekule na površini djeluju sile koje su

usmjerene u unutrašnjost kapljevine, što rezultira jačim privlačnim silama između susjednih molekula na površini – rezultanta sila nije jednaka 0 (slika 19).^{33,34}



Slika 19. Djelovanje sile između molekula kapljevine u unutrašnjosti i na površini kapljevine

Višak energije na površini kapljevine ili krutine u korelaciji je s veličinom slobodne energije površine i čvrstoćom prisutnih veza. Energija površine predstavlja rad potreban da se prekinu veze koje su prisutne između molekula na površini i u unutrašnjosti. Napetost površine tako se može definirati kao promjena slobodne energije površine po jedinici površine jednaka je radu potrebnom da se stvori 1 cm^2 nove površine.

Energija površine, točnije slobodna Gibbsova energija površine, G , predstavlja višak energije sustava povezan s površinom A (po jedinici površine) i definira se kao:

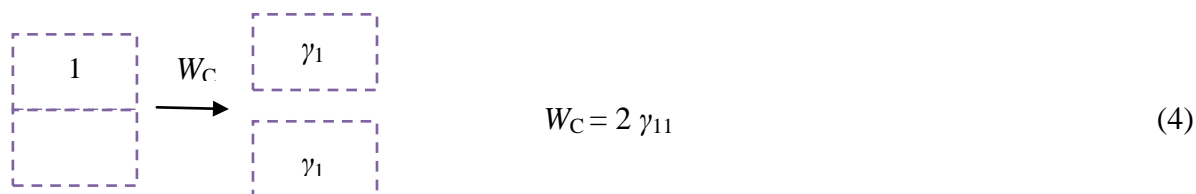
$$\Delta G = \gamma \Delta A \quad (3)$$

Ako se energija površine ne mijenja s povećanjem površine onda je napetost površine jednaka slobodnoj Gibbsovoj energiji površine ($\gamma = G$) i obrnuto.³³

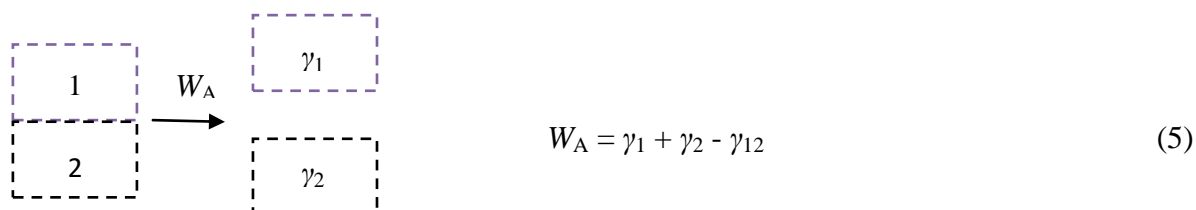
2.5.2. Parametri adhezije

Kohezijske i adhezijske sile posljedica su djelovanja sile između atoma ili molekula te su rezultat različitog naboja privlačenja između molekula. Pozitivni dio jedne molekule privlačiti će negativni dio susjedne molekule. Što su veće razlike između pozitivnog i negativnog naboja, i što su molekule bliže, sile privlačenja će biti jače. Adhezijske ili kohezijske sile mogu se pripisati molekulnim interakcijama kratkog i dugog djelovanja, odnosno djelovanju primarnih i sekundarnih sila.^{33,34}

Rad kohezije W_C je rad potreban da se prevladaju sile privlačenja između istovrsnih molekula kapljevine (ili krutine) i nastaju dvije nove površine s napetosti površine.



Rad adhezije W_A je rad potreban da se prevladaju sile privlačenja između dvije različite molekule u kapljevinu (ili krutini), jednak je novostvorenoj napetosti površine ($\gamma_1 + \gamma_2$) umanjenoj za međupovršinsku napetost (γ_{12}). W_A mogućava termodinamičko predviđanje jakosti interakcija na međupovršini dviju faza u kontaktu. Dupréova jednačba (5) predstavlja vezu rada adhezije s energijom površine γ .



Adsorpcijska teorija adhezije, predstavlja najznačajniju i najšire prihvaćenu teoriju, te pretpostavlja dovoljno bliski kontakt dviju faza na molekulnom nivou i uspostavljanje interakcija između atoma i molekula na međupovršini dviju faza. Jačina i vrsta veza na međupovršini ovisi o specifičnoj kemijskoj građi komponenata koje su međusobno u kontaktu.

Fowkes ističe aditivnost više komponenata u slobodnoj energiji površine. Pretpostavlja da se ukupna energija površine (γ) sastoji od različitih komponenata energije površine, od kojih svaka potječe od specifičnih međumolekulnih i međuatomskih sila na površini. Broj komponenata energije površine ovisiti će o strukturi tvari i interakcijama, disperzijske sile su univerzalne i uvijek prisutne. Slobodna energija međupovršine predstavlja zbroj komponenata povezanih s vrstama veza u skladu s kemijskom prirodom materijala.

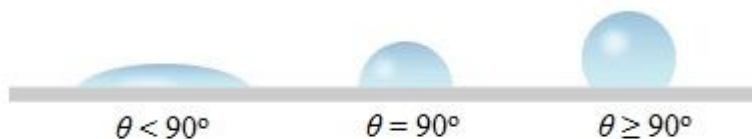
$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p + \gamma^h + \gamma^i + \gamma^{ab} + \gamma^m \dots \quad (6)$$

$$W = W^d + W^p + W^h + W^i + W^{ab} + W^m \dots \quad (7)$$

gdje su: (d) disperzijske sile - Londonove, (p) polarne sile - Keesomove,
 (h) vodikove veze, (i) Debyeve indukcijske sile, (ab) kiselo-bazne,
 (m) metalne veze i dr.

Određivanje slobodne površinske energije krutina i komponenata slobodne površinske energije između krutine i kapljevine temelji se na eksperimentima kvašenja. Kapljica kapljevine na ravnoj krutoj površini može se razliti preko površine ili preostati kao kapljica na površini i

zatvarati određeni kontaktni kut s površinom, koji je kvantitativna mjera kvašenja krutine kapljevinom, slika 20.³³⁻³⁵

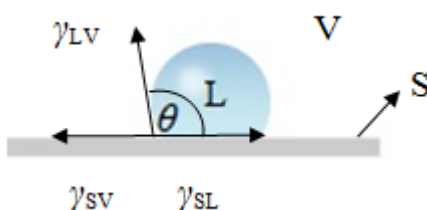


Slika 20. Kontaktni kut između kapljice i krute površine



Slika 21. Primjer superhidrofobne površine – lotosov list ($\theta > 180$)³⁶

Termodinamičko vlaženje temelji se na fizikalnoj adsorpcijskoj teoriji adhezije, a opisuje se Youngovom jednadžbom (6). Slobodna energija međupovršine može se pripisati svakoj međupovršini između krutine (S), kapljevine (L) i njenih para (V), a tri međupovršine su kruto-kapljevina (γ_{SL}), kruto-para (γ_{SV}) i kapljevina-para (γ_{LV}). Kako bi se postigla ravnoteža na na međupovršini kruto-kapljevina postojati horizontalna ravnotežna sila s određenim kontaktnim kutom (θ). Veliki kontaktni kut upućuje na slabu privlačnost koja rezultira višom slobodnom energijom međupovršine.³³⁻³⁵



Slika 22. Shematski prikaz određivanja kontaktnog kuta (θ) oblikovanog između tangente kaljice kapljevine (L) i krute površine (S); zrak, plin (V)

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (8)$$

$$\cos \theta = (\gamma_{SV} + \gamma_{SL}) / \gamma_{LV} \quad (9)$$

Young-Dupréova jednadžba (10) dobiva se povezivanjem Youngove jednadžbe koja se koristi za opis sustava u ravnoteži i Dupréova jednadžbe za rad adhezije. Ovim izrazom prikazan je odnos između veličine kontaktnog kuta (kvašenja) i jakosti interakcija (adhezije).

$$W_A = \gamma_{LV} (1 + \cos \theta) \quad (10)$$

Razlijevanje

Kada je $\theta > 0$ kapljevina se ne razlijeva po površini, a kada je $\theta = 0$ kapljevina potpuno vlai površinu i spontano se razlijeva preko površine brzinom koja ovisi o različitim faktorima, kao što je viskoznost kapljevine i hrapavost krute površine. Parametar koji predstavlja mjeru vlaženja naziva se koeficijet vlaženja (S) te predstavlja razliku rada adhezije i rada kohezije. Razlijevanje se događa kada koeficijet vlaženja poprima pozitivne vrijednosti, tj. veće od 0 i obrnuto. Prema Youngovoj jednadžbi, uz uvjet da je kontaktni kut $\theta = 0^\circ$ i uz pretpostavku da je ravnotežni pritisak razlijevanja zanemaren, vrijedi kriterij spontanog razlijevanja, jednadžba (11).³³⁻³⁵

$$S \geq W_A - W_C \geq \gamma_{SV} - \gamma_{LV} - \gamma_{SL} \quad (11)$$

2.5.3. Matematički modeli

Owens-Wendtov model je dvoparametarski model koji se zasniva na pretpostavci aditivnosti komponenata slobodne energije površine. Slobodna energija površine čiste faze i jednaka sumi doprinosa disperzijske, γ_i^d , i polarne komponente, γ_i^p , slobodne površinske energije.

$$\gamma_i = \gamma_i^d + \gamma_i^p \quad (12)$$

Owens-Wendtov model uključuje i pretpostavku prema kojoj je slobodna površinska energija međupovršine kruto-kapljevina, γ_{SL} , jednaka geometrijskoj sredini slobodnih površinskih energija pojedinih faza, S i L koje su međusobno u kontaktu:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (13)$$

Jednadžba modela dobiva se uvođenjem pretpostavke u Youngovu jednadžbu, (12).

$$W_A = \gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (14)$$

Drugi dvoparametarski matematički model koji se najčešće primjenjuje je *Wuov model*. Kod ovog modela također vrijedi pretpostavka aditivnosti komponenata slobodne površinske energije, te pretpostavka da je slobodna međupovršinska energija, γ_{SL} , jednaka harmonijskoj

sredini slobodnih površinskih energija pojedinih faza γ_S i γ_L koje su međusobno u kontaktu, izraz (15). Uvođenjem pretpostavke u Youngovu jednadžbu proizlazi jednadžba modela (16).

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 4 \gamma_S^d \gamma_L^d / (\gamma_S^d + \gamma_L^d) - 4 \gamma_S^p \gamma_L^p / (\gamma_S^p + \gamma_L^p) \quad (15)$$

$$W_A = \gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 4 \gamma_S^d \gamma_L^d / (\gamma_S^d + \gamma_L^d) + 4 \gamma_S^p \gamma_L^p / (\gamma_S^p + \gamma_L^p) \quad (16)$$

Van Ossov model je troparametarski model, a naziva se još i kiselo-bazni model. Prema van Ossu ukupna slobodna energija međupovršine predstavlja sumu Lifshitz-van der Waalsovih sila (γ^{LW}) i doprinosa kiselo-baznih sila (γ^{AB}). Lifshitz-van der Waalsove sile uključuju Kessomove i Debayove sile (nepolarne), djeluju na sve atome i molekule, uključujući i neutralne. Mogu djelovati na velikim udaljenostima čak do 10 nm i orijentirati molekule, za razliku kiselo-baznih sila koje su polarne i kratkog djelovanja (manje od 3 nm). Lewisovim kiselo-baznim vezama se smatraju međumolekularana djelovanja između Lewisovih kiselina (elektronakceptor) i Lewisove baze (elektronodonor) na površini.

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (17)$$

Promjena slobodne površinske energije uslijed Lifshitz-van der Waalsovih međudjelovanja može se prikazati kao suma komponenata energije površine, (18). Doprinos kiselo bazne komponente (AB) može se prikazati kao produkt elektron akceptorske i elektron par donorske komponente (19).

$$\gamma_{SL}^{LW} = 2 \sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} \quad (18)$$

$$\gamma_{SL}^{AB} = 2 \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2 \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (19)$$

Izraz za slobodnu energiju međupovršine kruto-kapljevito prema kiselo-baznom modelu izražen je jednadžbom (20), dok jednadžba (21) predstavlja model.

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right) \quad (20)$$

$$W_A = \gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right) \quad (21)$$

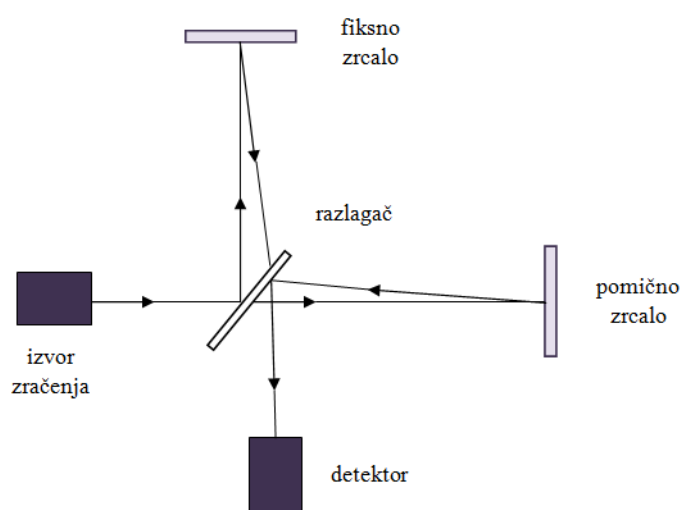
2.6. Površinske metode

2.6.1. Određivanje slobodne površinske energije

Slobodna površinska energija uzorka može se izračunati uz poznavanje kontaktnog kuta ispitne kapljicine na površini uzorka. Uređaj koji određivanje kontaktnog kuta naziva se goniometar. Mjerenje se provodi ispitnim kapljinama poznatih vrijednosti energije površine. Vrijednost energije površine ispitivanog uzorka dobiva se na osnovi kuta kapi na površini uzorka, poznate vrijednosti energije površine ispitnih kapljica i primjene odgovarajućeg matematičkog modela. Goniometar preko video sustava projicira sliku kapljice na zaslon računala i određuje poziciju kapljice s točnošću od ± 1 mm. Metoda viseće kapi je jedna od metoda mjerenja kontaktnog kuta.³³⁻³⁵

2.6.2. Fourier transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR)

Infracrvena spektroskopija je jedna od najraširenijih tehnika u istraživanjima karakterizacije površine. IR spektroskopija je osjetljiva na funkcionalne grupe, kvantitativna je i nedestruktivna tehnika. FTIR spektrometar ima izvor zračenja koji emitira infracrveno zračenje usmjereno na optički uređaj – interferometar (slika 23). Razlagač zraka prima ulaznu infracrvenu zraku i razdvaja je u dvije optičke zrake. Jedna zraka se reflektira od razlagača zraka prema fiksnom zrcalu i reflektira se natrag kroz razlagač u detektor. Druga zraka prolazi kroz razlagač zraka prema pokretnom zrcalu i reflektira se od razlagača u detektor. Zraka koja prolazi kroz uzorak sadrži određeni skup frekvencija, a ovisno o kemijskim skupinama koje sadrži, uzorak apsorbira neke frekvencije. Zbog toga što je put jedne zrake koja prolazi stalne duljine, a druge se stalno mijenja kako se zrcalo pomiče, signali koji izlaze iz interferometra rezultat su djelovanja tih dvaju zraka. Sve frekvencije se mjere istovremeno što dovodi do brzih vremena mjerenja. FTIR spektar dobiva se obradom interferograma algoritmom Fourierove transformacije.^{37,38}



Slika 23. Prikaz glavnih dijelova interferometra

Prigušena totalna refleksija (eng. *Attenuated total reflection*, ATR)

ATR tehnika omogućuje stvaranje mape i dubine profila raspodjele funkcionalnih grupa preko površine ili na udaljenosti od površine u masi uzorka. Ova metoda je vrlo osjetljiva za identifikaciju funkcionalnih grupa i time je moćna tehnika za karakterizaciju površine.

Uređaj za prigušenu totalnu refleksiju sastoji se od precizno izbrušenog kristala velikog indeksa loma. Uzorak se stavlja u bliski kontakt s prizmom materijala (germanij, silicij), a infracrveno zračenje se reflektira od međupovršine prizma/uzorak; kut ulaska u odnosu na kut loma definira se Snellovim zakonom (22).

$$n_0 \sin(\theta_0) = n_1 \sin(\theta_1) \quad (22)$$

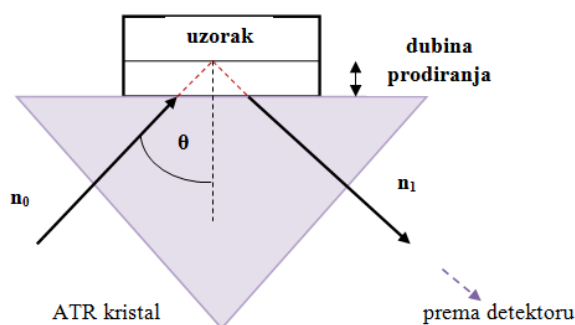
gdje je: n_0 – indeks loma prizme

θ_0 – kut upada

n_1 – indeks loma uzorka

θ_1 – kut loma

Reflektivnost međupovršine prizma/uzorak je potpuna sve dok je kut upadne zrake veći od kritičnog kuta, kada više nema putujućih valova prenesenih kroz uzorak. Bit ove metode je da optički rijeđe sredstvo apsorbira dio reflektiranog zračenja i prigušuje ga. ATR tehnikom dobivamo pikove na istoj valnoj duljini kao kod IR i FTIR tehnike, ali intenzitet može biti drugačiji. Dubina prodiranja direktno je proporcionalna valnoj duljini upadnog zračenja, reda je veličine 2 mm.^{35,38}



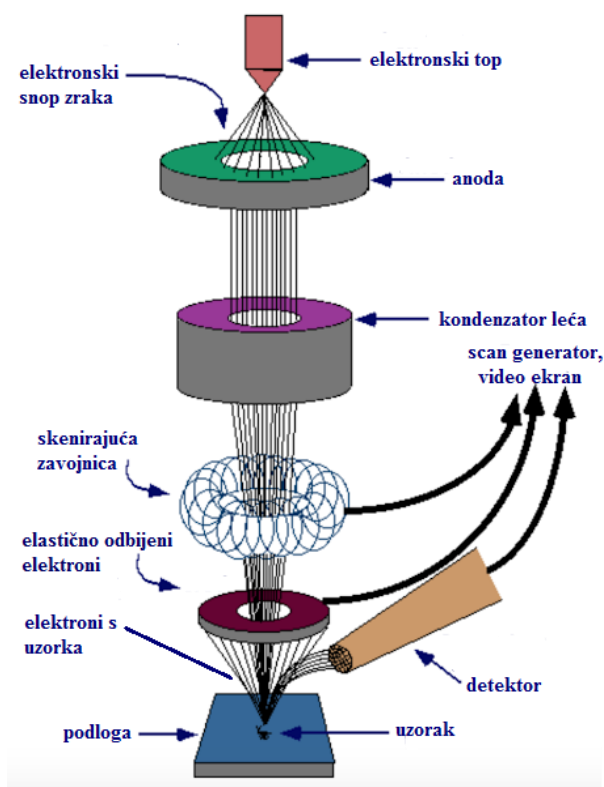
Slika24. Prikaz ATR kristala

2.6.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

SEM (eng. *Scanning electron microscopy*) je sofisticirana tehnika koja omogućava uvid u strukturu površine materijala sve do nanometarske razine, uz povećanje do 10^5 . Velika razlučivost (oko 10 nm), velika dubina polja pri svim povećanjim i nedestruktivnost su neke od karakteristika. Uzorci koji se analiziraju moraju biti vodljivi zbog analize sekundarnih elektrona s površine te pažljivo pripremljeni jer je moguće oštećenje površine uslijed djelovanja

elektronskih zraka visoke energije. Nevodljivi uzorci poput organskih moraju se predhodno prekriti tankim slojem zlata raspršivanjem ili vakuum uparavanjem.

Pretražni elektronski mikroskop koristi precizno fokusirani snop elektrona visoke energije koji se postiže pomoću katode (užarene volframove niti). Elektroni se ubrzavaju na putu između katode i anode, dalje se fokusiraju i usmjeravaju pomoću magnetskih leća na površinu uzorka. Metoda se temelji na identifikaciji sekundarnih elektrona, koji se oslobađaju od površine kod prijelaza elektronske zrake po točkama površine vodljivog uzorka smještenog u koloni pod vakuumom. Prilikom sudara s atomskom jezgrom atomi koji grade uzorak, elektroni iz elektronskog snopa mikroskopa se može odbiti natrag – elastično ili povratno odbijeni elektroni (eng. *backscattered electrons*). BSE detektor koristi se za proučavanje razlika u kemijskom sastavu uzorka, dok je sekundarni detektor pogodan za proučavanje morfologije uzorka. 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. Na SEM slici moguće je uočiti prostorne dubine uzorka iz rezultata kontrasta od topografije površine uzorka.³⁵



Slika 25. Shematski prikaz pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM)³⁹

2.7. Toplinske metode

2.7.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Najčešće korištena metoda koja omogućava mjerenje i karakterizaciju toplinskih svojstava materijala (polimera, farmaceutskih spojeva, organskih i anorganskih spojeva, minerala, gline, metala itd.) naziva se diferencijalna pretražna kalorimetrija. Primjenom ove metode dobiva se dobar uvid u toplinska svojstva materijala iako zahtjeva minimalnu količinu uzorka (nekoliko miligrama). Osnovno načelo rada DSC-a temelji se na zagrijavanju ili hlađenju uzorka i inertnog, referentnog materijala točno zadanom brzinom i kontroliranim uvjetima atmosfere. Tijekom mjerenja nema temperaturne razlike analiziranog i referentnog uzorka za što je nužno dovesti ili odveti određenu količinu topline (diferencijalna topline). Mjeri se razlika dovedene energije analiziranom i referentnom uzorku u ovisnosti o temperaturi ili vremenu koja je definirana programom. Kako bi se održala stalna razlika temperatura između analiziranog i referentnog uzorka potrebna je određena količina topline (dovedena ili odvedena) koja se zabilježi kao pik za DSC krivulji, te je ta vrijednostu svakom trenutku jednaka brzini apsorpcije ili oslobađanja energije u uzorku.

Pomoću diferencijalne pretražne kalorimetrije mogu se odrediti specifični toplinski kapacitet (C_p), promjena specifičnog toplinskog kapaciteta (ΔC_p), fazni prijelaza i njihove temperature (staklište, (T_g), talište (T_t), kristalište (T_c)), topline faznih prijelaza toplina kristalizacije (ΔH_c), topline taljenja (ΔH_t), kao i podaci o kemijskim reakcijama (polimerizaciji, oksidaciji, razgradnji).^{40,41}

2.7.2. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza je metoda kojom se prati promjena mase uzorka u ovisnosti o temperaturi i/ili vremenu tijekom kontroliranog zagrijavanja uzorka u uvjetima kontrolirane atmosfere. Ako se prati promjena mase uzorka u funkciji vremena uz stalnu temperaturu radi se o izotermalnoj termogravimetriji, ili neizotermalnoj (dinamičkoj) termogravimetriji ukoliko se prati se promjenjena mase u funkciji temperature. Promjena mase bilži se pomoću mikrovage. Zagrijavanjem uzorka u termogravimetrijskom analizatoru dolazi do reakcije razgradnje uzorka pri čemu nastaju kruti i plinoviti produkti. Ova analitička tehnika daje informacije vezane uz toplinsku postojanost i sastav uzorka, međuprodukata i produkata razgradnje, a moguće pratiti fizikalnih (sublimacija, hlapljenje, sorpcija) i kemijskih pojava. Iz termogravimetrijske i derivirane termogravimetrijske krivulje moguće je odrediti temperaturu početka razgradnje (T_{onset}), temperaturu kraja razgradnje (T_{end}), temperaturu pri maksimalnoj brzini razgradnje (T_{max}), gubitak mase u nekom razgradnom stupnju (Δm) te ostatnu masu uzorka (m).⁴⁰

2.8. Mehanička svojstva

Mehanička svojstva predstavljaju ponašanje materijala pod utjecajem nekog oblika mehaničkog naprezanja te su važan kriterij ocjene kvalitete i primjenskih svojstava materijala. Ponašanje materijala pod djelovanjem vanjskog opterećenja ovisi o kemijskoj prirodi materijala, a zatim i strukturi materijala. Mehanička svojstva materijala određuju se brojnim statičkim i dinamičkim metodama, a među najčešće primjenjivanim metodama je utvrđivanje ponašanja materijala u uvjetima naprezanje – deformacija. Rastezno ispitivanje je važna metoda ispitivanja utjecaja sile naprezanja na deformaciju i sklonost materijala prema lomu. Metoda daje uvid u potpuno ponašanje materijala od elastičnog istežanja do konačnog loma.

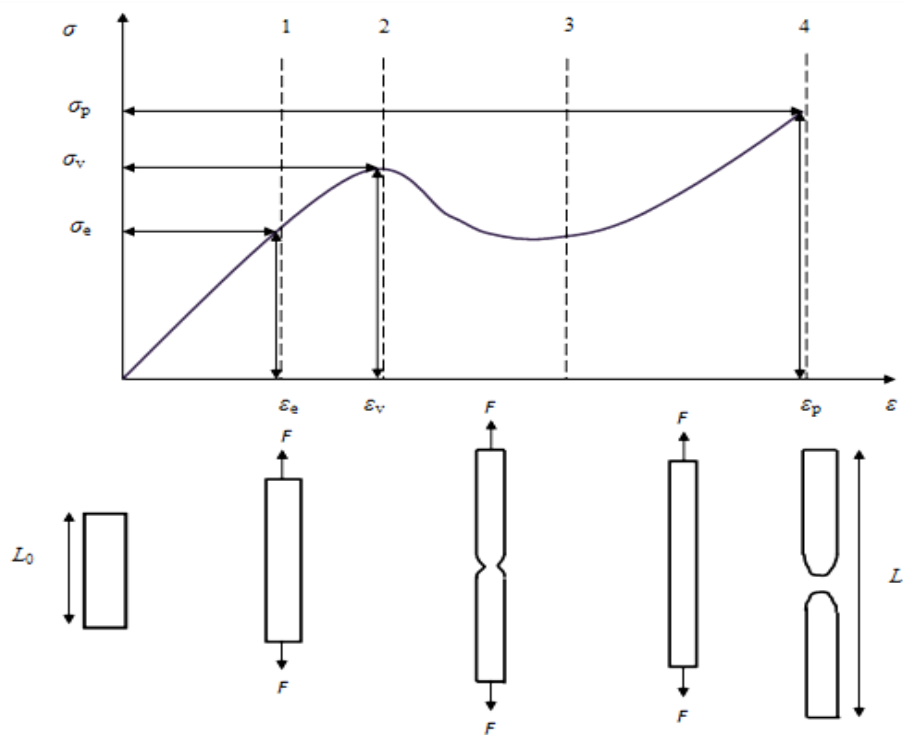
Mehanička svojstva materijala određuju se na epruvetama (uzorcima) koji moraju zadovoljiti standardom propisane dimenzije i oblik. Površina ispitnog materijala mora biti dobro obrađena bez ogrebotina i tragova obrade, jer pukotine i oštećenja predstavljaju slaba mjesto u strukturi i dolazi do popuštanja – tako dobiveni rezultati ne daju prave vrijednosti. Za ispitivanje čvrstoće koriste se epruvete kružnog, kvadratnog i pravokutnog presjeka koje se podvrgavaju vlačnom naprezanju na kidalici. Uzorci se podvrgavaju se postepenom porastu jednoosnog opterećenja sve do njezinog loma pri tome kidalica mora osigurati jednako prenošenje sile na epruvetu u uzdužnom pravcu uz istovremeno praćenje opterećenja, kao i izrada dijagrama.

Na slici 26 prikazana je krivulja naprezanje – istežanje te karakteristična područja koja ovise o vrsti materijala. Naprezanje, σ je definirano silom, F koja djeluje na jedinicu poprečnog presjeka epruvete, a izražava se u jedinicama za tlak N/mm^2 odnosno MPa. Deformacija je izražena kao istežanje, ε i predstavlja mjeru promjene duljine epruvete, L u odnosu na početnu duljinu epruvete, L_0 te je bezdimenzijska je veličina. Područje 1 je područje proporcionalnosti jer je naprezanje proporcionalno s deformacijom, slika 26. To je područje elastičnih – povrativih deformacija gdje vrijedi Hookov zakon (23). Rastezni modul, Youngov modul ili modul elastičnosti (E) predstavlja konstantu proporcionalnosti materijala.

$$\sigma = E \varepsilon \quad (23)$$

$$\varepsilon = (L - L_0)/L_0 \quad (24)$$

Maksimum na krivulji u području malih deformacija naziva granica razvlačenja ili vlačna čvrstoća (*eng. yield point*). Prijelaz iz linearnog u nelinearno područje, plastičnih – nepovrativih deformacija, gdje se materijal počinje trajno deformirati, definira σ_v (slika 26, točka 2). Područje „hladnog tečenja“ (područje 2–3) pogodno je za obradu vlaknatih materijala jer primjenom male sile dolazi do velikog istežanja. Naprezanje potrebno da se uzorak prekine predstavlja vrijednost prekidne čvrstoće (σ_p), dok istežanje kod kojeg se epruveta prekine predstavlja vrijednost prekidnog istežanja (ε_p). Energija, tj. rad potrebna za kidanje epruvete predstavlja površinu ispod krivulje i ujedno je mjera žilavosti materijala.^{1,34}



Slika 26. Deformacijska krivulja naprezanje – istezanje uz prikaz tijekom deformacije epruvete

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)

U ovome radu je korišten polimer poli(ϵ -kaprolakton), Polycaprolactone, Capa 68000, Perstorp, UK. PCL je linearni poliester visoke molekulske mase, kompatibilan s velikim brojem termoplasta. Biorazgradivi je polimer i nalazi široku primjenu. Fizikalna i mehanička svojstva Polycaprolactone, Capa 6800 dana su u tablici 3.

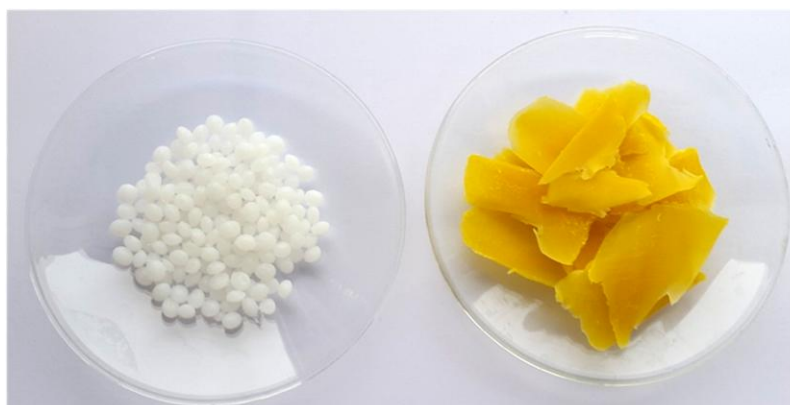
Tablica 3. Fizikalna i mehanička svojstva poli(ϵ -kaprolaktona), Polycaprolactone, Capa 68000

Fizikalna svojstva			
gustoća, g cm^{-3}	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

Pčelinji vosak (BW)

U radu je kao komponenta polimerne mješavine uz poli(ϵ -kaprolakton) korišten i pčelinji vosak. Domaći nerafinirani pčelinji vosak ima talište na 62 °C te je prikazan na slici 27. BW je odabran kao prirodna komponenta specifičnih svojstava koja izuzev plastificirajućih, posjeduje i dezinfekcijska svojstva.



Slika 27. Prikaz granula PCL polimera i listića pčelinjeg voska

Hankova otopina soli (HBSS)

Za pripremu Hankove otopine soli (eng. *Hank's balanced salt solution, HBSS*) korištene su sljedeće kemikalije:

- Natrijev klorid, p.a. čistoće, Gram Mol
- Kalijev klorid, p.a. čistoće, T.T.T. d.o.o.
- Kalijev dihidrogenfosfat, p.a. čistoće, Gram Mol
- Natrijev hidrogenfosfat, p.a. čistoće, Gram Mol
- Magnezijev sulfat, p.a. čistoće, Gram Mol
- Kalicijev klorid, p.a.a čistoće, Sigma Aldrich
- Natrijev hidrogenkarbonat, p.a. čistoće, Kemika
- Glukoza
- Deionizirana voda

Enzim

U radu su za enzimsku razgradnju korištena dva enzima lipaze: *Candida cylindracea* (Lyophilisat), proizvođača Boehringer Mannheim GmbH, Njemačka i *Thermomyces lanuginosus* proizvođača Sigma Aldrich. Primjenjene lipaze su mikrobiološkog porijekla.

Enzim *Candida cylindracea* 9,85 mg sadrži 5000 U/g (aktivnih jedinica), dok lipaza *Thermomyces lanuginosus* sadrži više od 100 000 U/g. Lipaza je *Thermomyces lanuginosus* tekućina svijetlo žute boje i vrijednosti pH u rasponu od 6,5 do 7,5 u 0,01 g/L. Enzimi su čuvani na suhom mjestu pri temperaturi od 2 do 8 °C.

3.2. Priprava PCL/BW mješavina

PCL/BW mješavine različitih sastava pripravljene su miješanjem određene mase polimera (PCL) i pčelinjeg voska (BW) u laboratorijskom uređaju za zamješavanje u talini, tablica 4.

Tablica 4. Potrebna masa PCL-a i BW za željeni sastav PCL/BW mješavine

Uzorak	Sastav	m(PCL), g	m(BW), g
PCL/BW	100/0	40,0	0,0
PCL/BW	70/30	28,0	12,0
PCL/BW	50/50	20,0	20,0
PCL/BW	0/100	0,0	40,0

Brabender gnjetilica, slika 28. se sastoji od dvije povezane komore u kojima dva gnjetila rotiraju u suprotnom smjeru s uskim međuprostorom uza stijenku. Kod Brabender gnjetilice važni parametri su temperatura, brzina i vrijeme umješavanja kako bi se dobile

homogene mješavine. Temperatura ne smije biti puno viša od temperature taljenja materijala jer može doći do toplinske razgradnje uzorka.

PCL/BW mješavine različitih sastava (100/0, 70/30, 50/50, 0/100) zamješane su u Brabender gnjetilici, uz brzinu rotacije gnjetila 60 min^{-1} u vremenu od 5 minuta, slika 28. Pri umješavanju navedenih mješavina ključnu ulogu je imala temperatura jer je temperaturno područje taljenja pčelinjeg voska vrlo široko. PCL/BW mješavina sastava 100 % PCL-a pripravljena je pri temperaturi od $100 \text{ }^\circ\text{C}$, dok su mješavine PCL/BW sastava 70/30 i 50/50 zamješane pri nižoj temperaturi, $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Kod mješavine bez polimera, odnosno 100 % BW nije proveden proces zamješavanja već samo proces prešanja.



Slika 28. Brabender gnjetilica

Nakon definiranog vremena umješavanja, 5 minuta, mješavina PCL-a i BW-a izvađena je iz gnjetilice i hlađena na sobnoj temperaturi. Dobivena talina prebačena je na teflonsku podlogu i usitnjena rezanjem.

Pločice PCL i PCL/BW mješavina pripremljene su prešanjem na hidrauličkoj preši *Fontune*, slika 29. Usitnjeni materijal raspoređen je između dvije metalne ploče obložene teflonskom folijom i zatim stavljen između zagrijanih ploča preše. Pločice za ispitivanja prešane su u kalupu dimenzija 12×12 pri temperaturi od $200 \text{ }^\circ\text{C}$ (PCL) i $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (mješavine PCL/BW različitih sastava), tlaku od $24,5 \text{ bar}$ (25 kp/cm^2). Mješavina sa 100 % BW oblikovana je pri temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku od $24,5 \text{ bar}$. Vrijeme provedbe procesa oblikovanja polimernih mješavina (prešanja) je 7 minuta, uz 2 minute predgrijavanja i 5 minuta prešanja. Nakon toga, preša je hlađena vodom koja prolazi kroz ploče sustavom cijevi – provedeno je hlađenje pod tlakom do $30 \text{ }^\circ\text{C}$, a potom su uzorci izvađeni iz kalupa.



Slika 29. Hidraulička preša *Fortune*

3.3. Priprava Hankove otopine soli (HBSS)

Enzimaska razgradnja PCL/BW mješavina različitog sastava provedena je u Hankovoj otopini soli (HBSS) inkubiranjem pri temperaturi od 20 °C. HBSS otopina je izotonična otopina čiji je zadatak održavanje pH vrijednosti (~7,0-7,4) i osmotskog tlaka u uzorku. Otopina soli pripravljena je u odmjernoj tikvici od 1000 mL, a potrebne kemikalije prikazane su na slici 30. Točne odvage soli izvagane su na analitičkoj vagi te su dane u tablici 5.

Tablica 5. Komponente HBSS otopine

Komponenta	masa, mg
Natrijev klorid, NaCl	8000,50
Kalijev klorid, KCl	400,30
Kalijev dihidrogenfosfat, KH₂PO₄	60,40
Natrijev hidrogenfosfat, Na₂HPO₄	48,30
Magnezijev sulfat, MgSO₄ x 4 H₂O	98,10
Kalicijev klorid, CaCl₂	140,10
Glukoza, C₆H₁₂O₆	1000,50
Natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO₃	350,10

Prije dodatka soli u tikvicu uliveno je 90 % tražene ukupne količine vode. Dodavan je jedan po jedan sastojak uz miješanje bez zagrijavanja, kako bi se sol potpuno otopila i dobila homogena otopina. Nakon što su otopljene sve soli dodano je 350 mg/L natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO₃) i preostala količina vode.

Svaki tjedan koliko je trajala enzimska razgradnja pripravljena je i promjenjena HBSS otopina u preostalim bočicama s uzorcima.



Slika 30. Kemikalije za pripravu HBSS otopine

3.4. Postupak enzimske razgradnje

U tikvicu od 1000 mL pripremljene HBSS otopine dodano je 1,0 mg enzima lipaze *Candida cylindracea* prikazane na slici 31. U HBSS otopinu (1000 mL) dodano je 10 mL enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*.

Uzorci PCL i PCL/BW mješavina dimenzija 10 x 120 mm izvagani su na analitičkoj vagi i stavljeni u bočice s čepom volumena 50 mL. U svaku bočicu je postavljeno po 5 pločica, s razmakom od 1 mm između pojedine pločice i uliveno 50 mL HBSS otopine. Tako pripravljene bočice s uzorcima i otopinom stavljene su u inkubator na temperaturu od 20 °C. Na slici 32 prikazane su pločice PCL, BW polimera i PCL/BW mješavine 50/50 i 70/30 za enzimsku razgradnju u trajanju od 5 tjedana u lipazi *Candida cylindracea*.



Slika 31. Enzim lipaze *Candida cylindracea*

Nakon različitih vremena enzimske razgradnje (168, 336, 504, 840 sati) uzorci su izvađeni iz otopine, isprani vodom i dezinfekcijskim sredstvom, posušeni na filtarskom papiru i izvagani na analitičkoj vagi. Uzorci su sušeni do stalne mase pri sobnoj temperaturi i zatim je provedena njihova karakterizacija. Promjena mase, točnije postotni gubitak mase izračunat je prema izrazu (25).

$$GM = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100 \quad (25)$$

gdje je: GM – gubitak mase, %

m_0 – početna masa, g

m_t – masa nakon vremena t , g

Količina vode koja prođe u uzorak ili apsorbirana količina vode izražena u postotku dan je jednadžbom (26). Prema izrazu (26) apsorbirana voda predstavlja omjer razlike mase mokrog uzorka i uzorka nakon postizanja stalne mase u određenom vremenu i mase uzorka stalne mase u vremenu t .

$$\Delta m_v = \frac{m_v - m_t}{m_t} \cdot 100 \quad (26)$$

gdje je: Δm_v – apsorbirana voda, %

m_v – masa mokrog uzorka, g





Slika 32. Bočice s uzorcima PCL, BW i PCL/BW mješavina prije stavljanja u inkubator i inkubator

3.5. Tehnike karakterizacije

3.5.1. Određivanje površinskih svojstava

3.5.1.1. Mjerenje kontaktnog kuta

Mjerenje kontaktnog kuta provedeno je na goniometru *DataPhysics OCA 20 Instruments, GmbH*, slika 33. Mjerenje kontaktnog kuta provedeno je na pločicama PCL i BW s ispitnim kapljevina vodom i dijodometanom pri temperaturi od 23 °C i relativnoj vlažnosti 60 %. U tablici 6. su dane vrijednosti disperzijske i polarne komponente slobodne površinske energije te ukupna slobodna površinska energija kapljevina prema literaturi.



Slika33. Goniometar *DataPhysics OCA 20 Instruments, GmbH*

Prije početka mjerenja uzorak se očisti od načistoća i masnoća 2-propanolom te postavi na podesivi stolić za mjerenje. Goniometar posjeduje optički mikroskop s CDD videokamerom (rezolucije 768 s 576 piksela) koji je spojen na računalo te omogućava praćenje uzorka i kapljice uz veliko povećanje (korišteno 2,5 x). Na pločicu uzorka postavljena je kapljica testne (ispitne) kapljevine volumena 2 μL pomoću sustava za injektiranje. Vrijednost kontaktnog kuta koji kapljica zatvara s krutinom (uzorkom) mjerena je nakon uspostavljanja ravnotežnog stanja (~10 sekundi). Kontaktni kut je mjereno na 5 do 10 različitih mjesta, a iz dobivenih vrijednosti određena je prosječna vrijednost. Primjenom definirane baze podataka o napetosti površine kapljevine i matematičkih modela određene su vrijednosti površinske energije pojedine komponente.

Tablica 6. Vrijednosti disperzijske i polarne komponente slobodne površinske energije i ukupne slobodne površinske energije (prema literaturi)

Kapljevina	Slobodna površinska energija, mJ m^{-2}		
	γ^d	γ^p	γ
voda	21,80	51,00	72,80
dijodometan	50,80	0,00	50,80

Na pločicama čistih komponenata i PCL/BW mješavina nakon različitih vremena enzimske razgradnje mjereno je kontaktni kut s vodom pri navedenim uvjetima.

3.5.1.2. FTIR-ATR analiza

FTIR spektri PCL polimera i PCL/BW mješavina snimljeni su pomoću *Perkin Elmer Spectrum One Spectrometer* spektrometra korištenjem *Single Reflection ATR System*, slika 34. Uzorci PCL/BW mješavina različitog sastava snimljeni su prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u području valnih duljina od 500 do 4000 cm^{-1} , pri rezoluciji 4 cm^{-1} akumulirajući rezultat 4 skena.



Slika 34. FTIR spektrometar, *Perkin Elmer Spectrum One Spectrometers* ATR sustavom

3.5.1.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija PCL polimera i mješavina PCL/BW praćena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM) *Tescan Vega 3, Bruker*, slika 35.



Slika 35. Pretražni elektronski mikroskop *Tescan Vega 3, Bruker*

Površina uzoraka prekrivena (naparena) je slojem zlata u uređaju za napanje (slika 36) kako bi se postigla vodljivost. Zlatom prekriveni uzorci postavljeni su u komoru za uzorke gdje je tlak bio 10^{-5} Pa. Uzorci PCL i PCL/BW mješavina snimani su pri naponu od 20 kV i različitim povećanjima. Površina kao i mjesto popuštanja (kidanja) PCL polimera, pčelinjeg voska i PCL/BW mješavina snimljena je prije i nakon 5, odnosno 2 tjedna enzimske razgradnje.



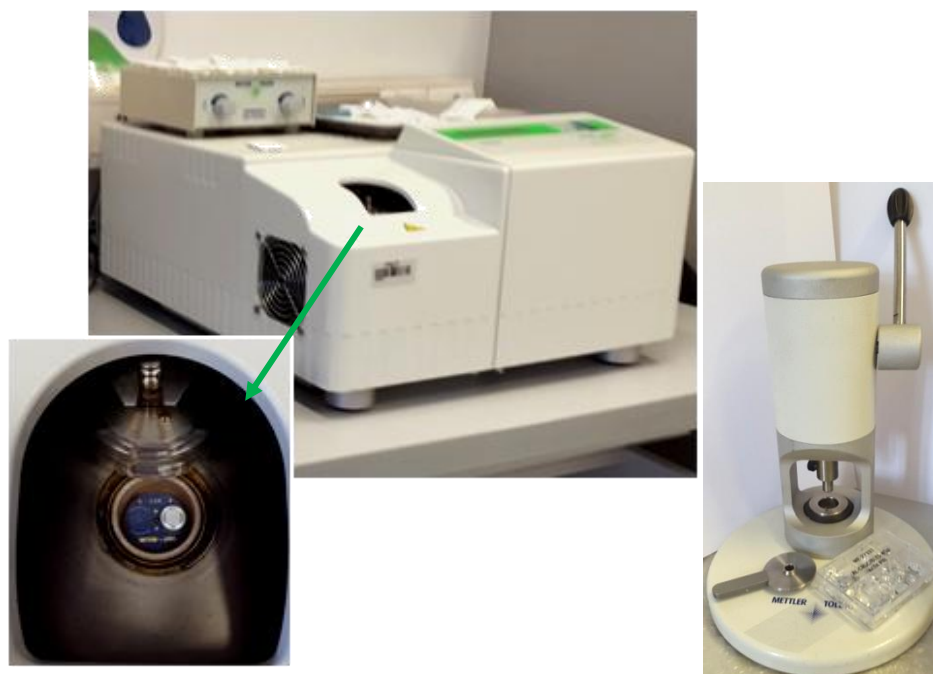
Slika 36. Uređaj za napanje vodljivog sloja zlata i uzorci za napanje

3.5.2. Određivanje toplinskih svojstava

3.5.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Toplinska svojstva PCL i PCL/BW mješavina određena su tehnikom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC), na uređaju *Mettler Toledo DSC 823e*, slika 37. Uzorci mase ~10 mg stavljani su u aluminijske posudice i hermetički zatvoreni pomoću preše, slika 37. Pripremljena posudica s uzorkom stavljena je u uređaj. Ispitivanja su provedena u inertnoj struji N₂ pri protoku od 50 cm³/min uz hlađenje hladnjakom (*eng. Intracooler*) pri brzini zagrijavanja/hlađenja od 10 °C/min. Mjerenja su provedena u dva ciklusa zagrijavanje – hlađenje u temperaturnom području od -85 do 150 °C.

Prvi ciklus zagrijavanja proveden je kako bi se zaboravila povijest pripreme uzorka, u temperaturnom intervalu od -85 do 80 °C. Toplinska svojstva uzoraka mjerena su prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje pri istim uvjetima.



Slika 37. Diferencijalni pretražni kalorimetar *Mettler Toledo DSC 823e*, preša i aluminijske posudice

Postotak kristalnosti uzorka određen je prema jednadžbi (27), pri čemu je kristalnost uzorka proporcionalna toplini taljenja potpuno kristalnog polimera (100 %), koja za PCL iznosi 142,5 J/g.

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0(1-w)} \quad (27)$$

gdje je: X_c – stupanj kristalnosti PCL polimera

ΔH_m – entalpija (toplina) taljenja

ΔH_m^0 – entalpija (toplina) taljenja 100 % PCL-a

3.5.2.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Toplinska stabilnost PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina određena je primjenom termogravimetrijske analize na uređaju *TA Instruments Q500*, slika 38. Pripremljeni uzorci mase ~ 10-12 mg zagrijavani su u otvorenom platinskom lončiću u inertnoj atmosferi dušika (N₂) protoka 60 cm³/min. Mjerenja su provedena u temperaturnom području od 25 do 600 °C, pri brzini zagrijavanja od 10 °C /min. Promjena toplinske stabilnosti PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina praćena je prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje.



Slika 38. Termogravimetrijski uređaj *TA Instruments Q500* i platinski lončić

3.5.3. Određivanje mehaničkih svojstava

Mehanička svojstva PCL polimera i BW-a te PCL/BW mješavina ispitana su na uređaju za mehanička ispitivanja *Zwick1445*. Na slici 39. je prikazana mehanička kidalica *Zwick1445*. Mjerena su mehanička svojstva PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje. Mjerenje je provedeno pri brzini rastezanja uzoraka 50 mm/min i razmaku čeljusti kidalice 50 mm. Prilikom mjerenja važnu ulogu imala je temperatura, te su sva mjerenja provedena pri 20 °C.



Slika 39. Mehanička kidalica *Zwick1445*

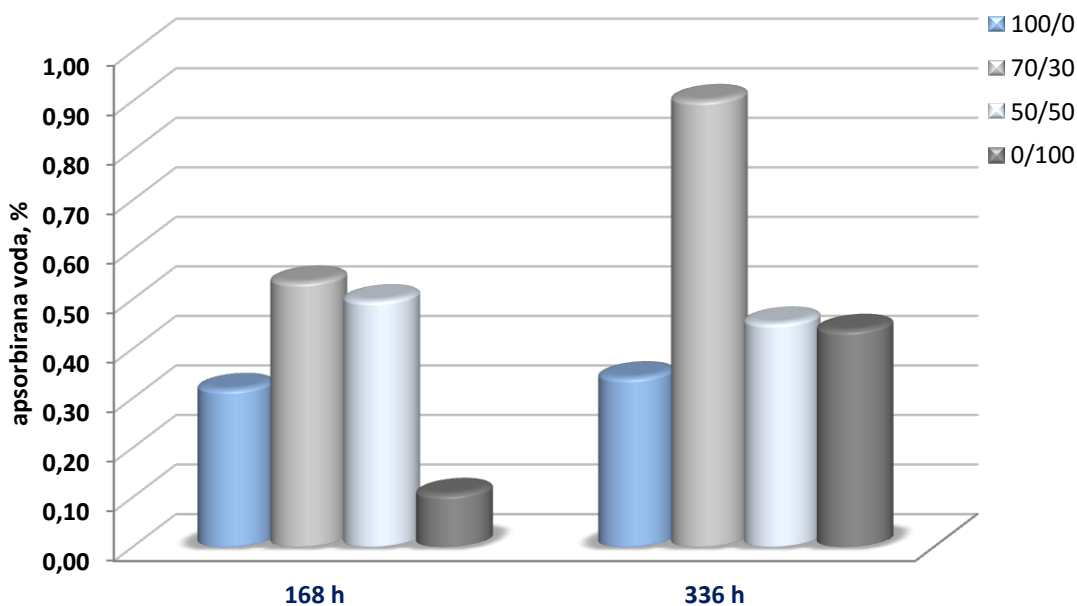
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj enzima lipaze na promjenu mase

4.1.1. Promjena mase tijekom 2 tjedna

S ciljem utvrđivanja djelovanja enzima lipaze na mješavine PCL polimera i pčelinjeg voska (BW) različitog sastava praćena je promjena mase tijekom 5 tjedana u otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* i druga serija 2 tjedna u otopini *Thermomyces lanuginosus* lipaze. U određenom vremenskom intervalu (168, 336, 504, 672, 840 sati) uzorci su izvađeni iz Hankove puferirane otopine soli (HBSS), isprani destiliranom vodom i izvagani. Uzorci su sušeni do stalne mase na sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana, a potom su izvagani. Promjena mase određena je na osnovi razlike mase prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje.

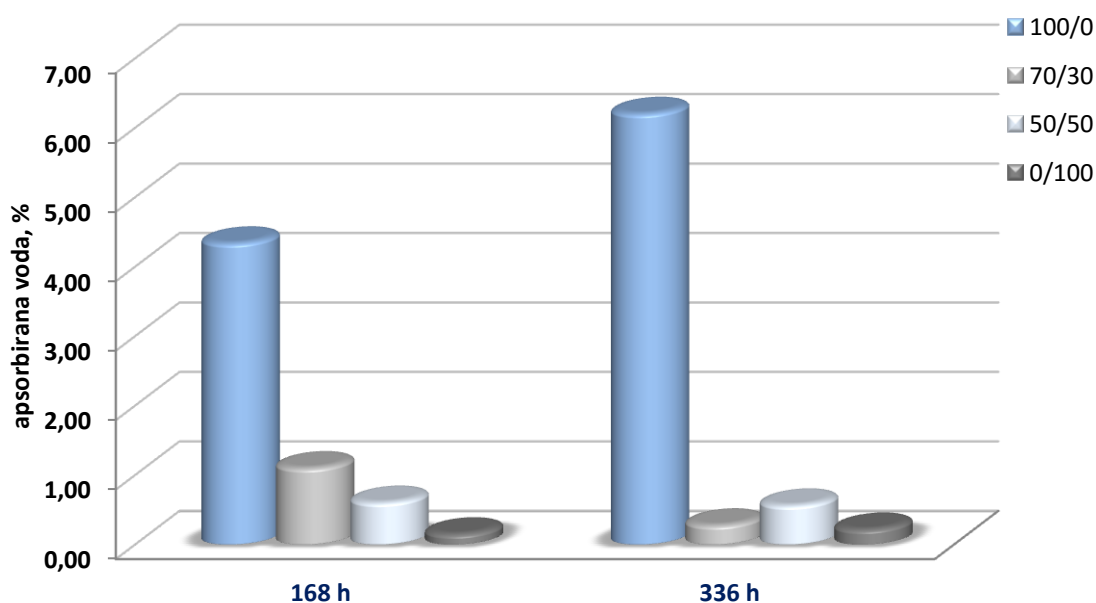
Na slici 40. prikazana je količina vode koju su PCL/BW mješavine određenog sastava apsorbirale tijekom određenog vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini. Prodor vode stvara negativni gradijent koncentracije vode od površine uzorka prema unutrašnjosti materijala. No, ovakav predznak gradijenta koncentracije nestaje za par sati ili dana ovisno o temperaturi, debljini ili hidrofobnosti materijala.



Slika 40. Ovisnost apsorbirane vode PCL/BW mješavina različitog sastava o vremenu enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*

Vrijednosti apsorbirane vode izražene u postotku dobivene se prema jednadžbi (27). Vidljivo je da čista komponenta PCL kao i PCL/BW mješavina 70/30 upija veću količinu vode tijekom 2 tjedna (336 sati) enzimske razgradnje. Mješavina PCL/BW 50/50 pokazuje nešto manju vrijednost apsorbirane vode nakon 2 tjedna enzimske razgradnje. Najveću promjenu vrijednosti apsorbirane vode u vremenskom intervalu od 2 tjedana pokazuje čista komponenta

BW. Vrijednost apsorbirane vode nakon 336 sati u odnosu na 168 sati razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* povećala se za 9,3 puta. PCL polimer izložen starenju u otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus* tijekom 2 tjedna, pokazuje vrijednost apsorbirane vode 7,5 % što je 18 puta veća količina u odnosu na PCL u otopini lipaze *Candida cylindracea*. Količina vode koju uzorak BW-a upije je približno jednaka u obje primjenjene otopine lipaze te iznosi oko 0,2 %. BW nakon 2 tjedna enzimske razgradnje pokazuje promjenu mase od svega 0,5 %, što je 15 % veća promjena mase (brzina razgradnje) istog uzorka tretiranog lipazom *Candida cylindracea*. Izrazita hidrofobnost pčelinjeg voska onemogućava bržu difuziju molekula vode u unutrašnjost materijala i proces razgradnje.



Slika 41. Ovisnost apsorbirane vode PCL/BW mješavina različitog sastava o vremenu enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*

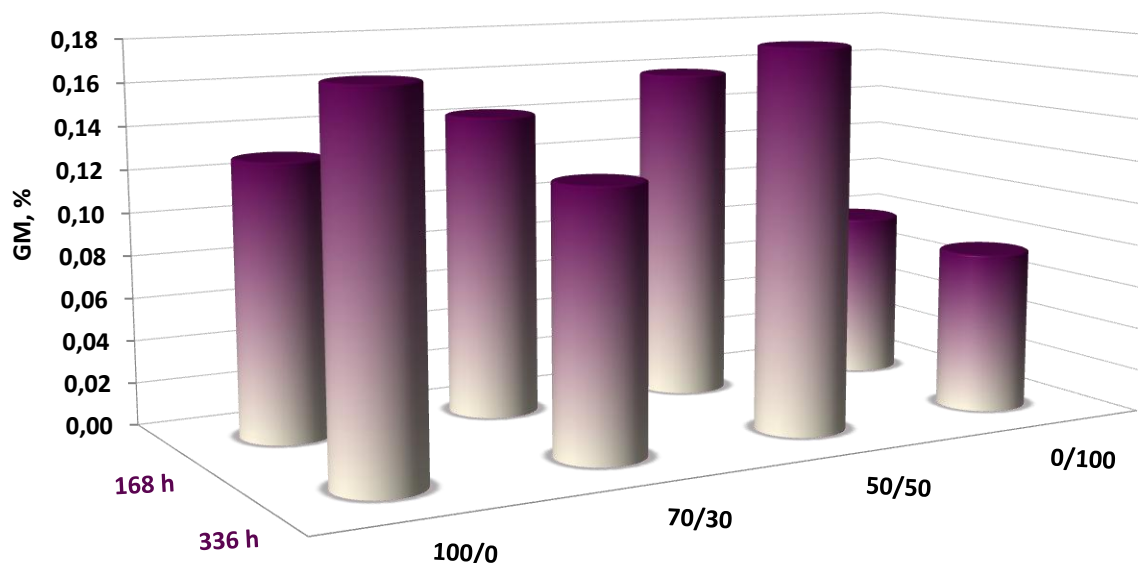
Na slikama 42. i 43. prikazan je postotni gubitak mase (GM) PCL i PCL/BW mješavina različitog sastava u ovisnosti o vremenu razgradnje (168, 336 sati) u Hankokoj puferiranoj otopini soli uslijed djelovanja enzima lipaze *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*.

Iz grafičkog prikaza je vidljivo da u HBSS otopini s lipazom *Candida cylindracea* tijekom 2 tjedana dolazi do neznatnog gubitka mase PCL i PCL/BW mješavina. Iako mala, promjena mase ukazuje na katalitičku aktivnost primjenjenog enzima lipaze na PCL i BW. Budući da je enzimska razgradnja provedena pri 20 °C, najveća i optimalna aktivnost enzima (pri 25 °C) je nešto niža što ima za posljedicu smanjenu brzinu razgradnje uzoraka.

Na brzinu razgradnje, odnosno sposobnost prodiranja vode u materijal utječu stupanj kristalnosti i kemijski sastav materijala te medij u kojem se uzorak nalazi. Brzina enzimske razgradnje čistog PCL polimera u odnosu na čisti pčelinji vosak nakon 2 tjedna je brža za 2,3 puta. Promjena mase PCL-a u usporedbi s BW, nakon 336 sati u HBSS otopini enzima lipaze

Candida cylindracea, je 45 % veća. Brzina razgradnje čistih komponenata PCL i BW u lipazi *Thermomyces lanuginosus* je značajno veća nego u otopini lipaze *Candida cylindracea*, što je prikazano na slikama 42. i 43.

Postotni gubitak mase za PCL i PCL/BW mješavine 50/50 raste, dok se za mješavinu s većim udjelom PCL polimera (70 %) i pčelinji vosak (BW) smanjuje nakon 168 sati enzimske razgradnje. Najveće vrijednosti promjene mase uočavaju se kod PCL/BW mješavine sastava 50/50 u HBSS otopini s lipazom *Candida cylindracea*.

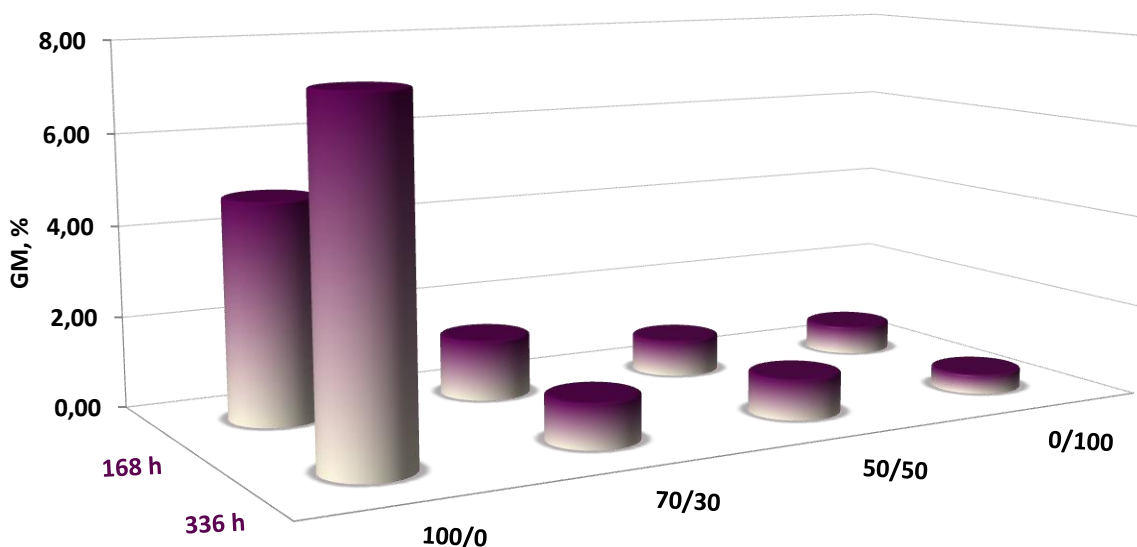


Slika 42. Gubitak mase PCL/BW mješavina različitog sastava tijekom 2 tjedna u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea*

Na slici 43. prikazan je postotni gubitak mase PCL/BW mješavina različitog sastava nakon 168 i 336 sati razgradnje u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*. Nakon 336 sati razgradnje uslijed djelovanja ove lipaze može se uočiti značajna promjena mase kod svih istraživanih uzoraka. Brzina razgradnje kontinuirano raste kroz 2 tjedna enzimske razgradnje, a najveća promjena mase dobivena je za PCL polimer. Promjena mase PCL-a nakon 336 sati iznosi oko 3,5 %, dok je vrijednost promjene mase čistog BW-a 0,5 %.

Brzina razgradnje pčelinjeg voska mala, 7 puta manja od razgradnje PCL-a. Uzimajući u obzir složen sastav i kristalnu strukturu pčelinjeg voska (BW) te izrazitu hidrofobnost mala brzina razgradnje je očekivana. Ako uspoređujemo promjenu mase (brzinu razgradnje) čistih komponenata uslijed djelovanja enzima lipaze *Candida cylindracea*, razgradnja polimera i pčelinjeg voska veća je za 44, to jest 6 puta u HBSS otopini s lipazom *Thermomyces lanuginosus*. PCL/BW mješavine pokazuju znatno manju promjenu mase u otopini lipaze *Candida cylindracea*. Najveću promjenu mase pokazuje PCL potom slijedi mješavina s većim udjelom PCL polimera. Velike razlike u dobivenim vrijednostima obje primjenjene lipaze u

istom vremenu intervalu, posljedica su velike aktivnosti enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*.



Slika 43. Gubitak mase PCL/BW mješavina različitog sastava tijekom 2 tjedna u HBSS otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*

4.1.2. Promjena mase tijekom 5 tjedana

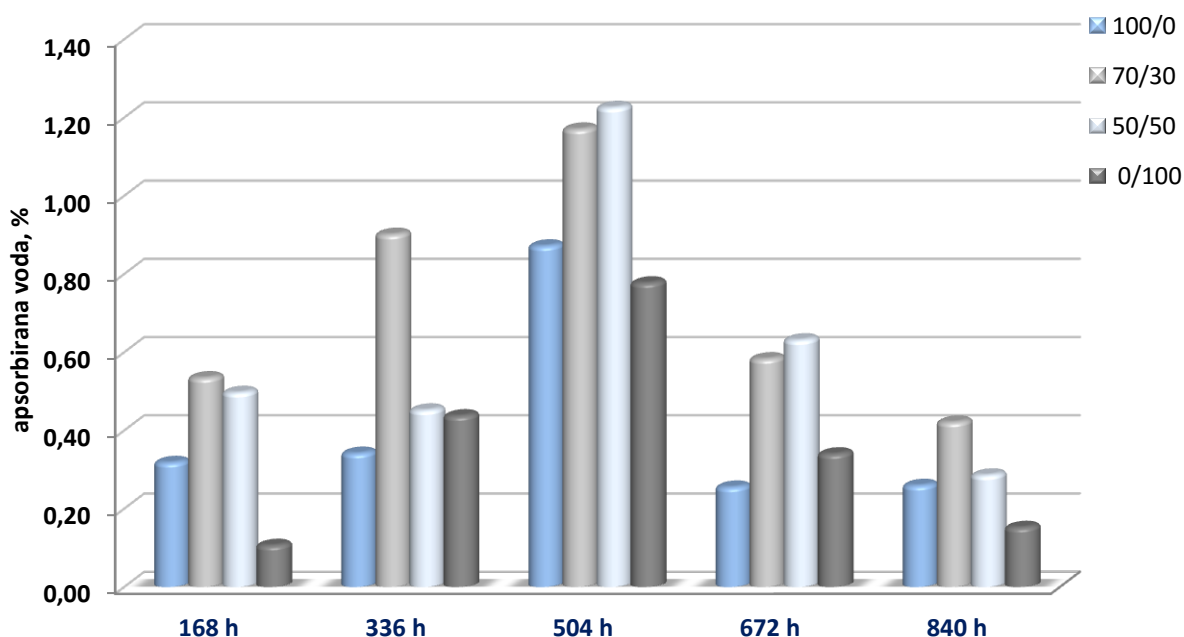
Enzimska razgradnja PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina praćena je tijekom 5 tjedana. Svaki tjedan, koliko je trajala enzimska razgradnja, bilježena je masa mokrih pločica PCL/BW mješavina različitog sastava te masa istih nakon postizanja stalne mase.

Na slici 44. prikazana je količina vode koju je pojedina PCL/BW mješavina apsorbirala u ovisnosti o vremenu enzimske razgradnje.

Iz rezultata je vidljivo da količina apsorbirane vode raste tijekom vremena enzimske razgradnje (672 h), a daljnje izlaganje tijekom 2 tjedna ne rezultira povećanjem prodora vode u unutrašnjost uzoraka. Najveću vrijednost apsorbirane vode tijekom 5 tjedana enzimske razgradnje pokazala je mješavina PCL/BW sastava 70/30, dok je najmanja vrijednost dobivena za čistu komponentu pčelinji vosak (BW).

Tijekom 672 sata (3 tjedna) enzimske razgradnje uočava se kontinuirani rast apsorbirane vode u funkciji vremena. PCL/BW mješavina 50/50 tijekom 672 sata razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* pokazala je najveću vrijednost apsorbirane vode koja iznosi 1,23 %, potom slijedi mješavina PCL/BW sastava 70/30 i PCL s 1,17 % tj. 1,79 % apsorbirane vode. Kontinuirano sniženje prodora vode u unutrašnjost ispitnih pločica vidljiv je nakon 672 sata razgradnje, slika 44. Kod čistih komponenata PCL i BW polimera te

PCL/BW mješavina različitog sastava nakon 672 sata uočava se značajan pad vrijednosti apsorbirane vode za 50 % u odnosu na vrijeme razgradnje od 504 sata. Daljnji pada prodora voda vidljiv je i nakon 840 sati enzimske razgradnje.



Slika 44. Ovisnost apsorbirane vode PCL/BW mješavina različitog sastava o vremenu enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*

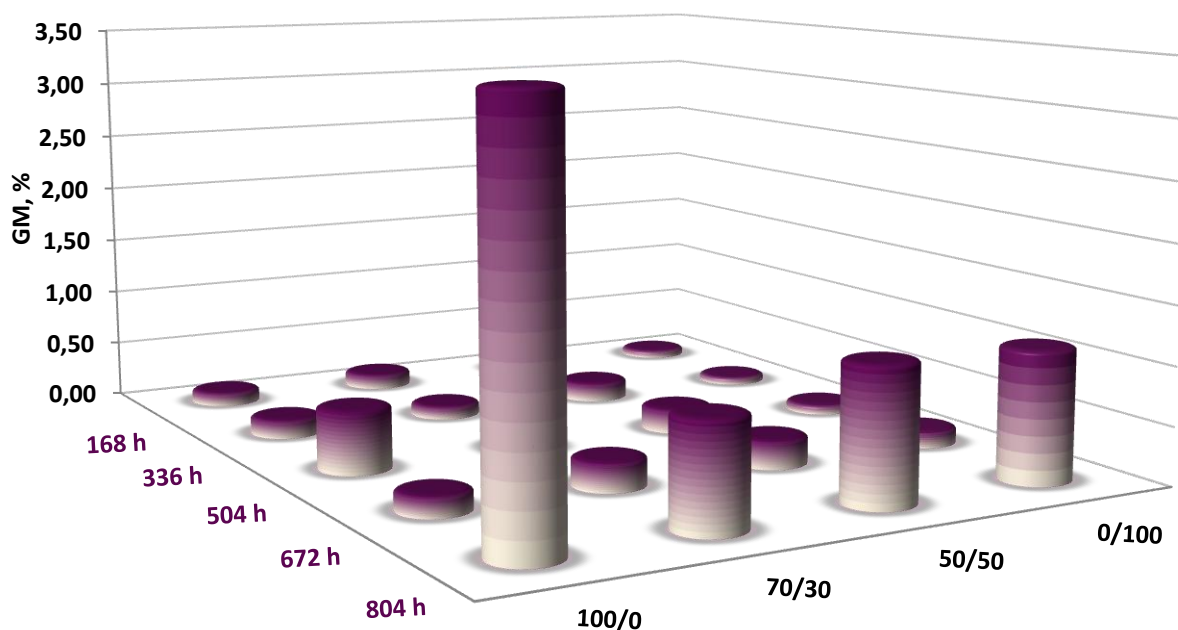
Na slici 45. prikazan je postotni gubitak mase PCL/BW mješavine različitog sastava u funkciji vremena razgradnje u HBSS otopini *Candida cylindracea*.

Na osnovi rezultata promjene mase tijekom 5 tjedana enzimske razgradnje vidljiv je diskontinuirani slijed razgradnje. Uočava se značajniji porast promjene mase nakon prvog tjedna razgradnje te se pretpostavlja da je razlog tomu lakša razgradnja zbog već narušene strukture. Na osnovi dobivenih rezultata vidljiv je kontinuirani gubitak mase kod PCL polimera te PCL/BW mješavine 50/50, kroz 672 sata razgradnje. Čista komponenta BW te mješavina s većim udjelom PCL polimera pokazuju veće promjene gubitka mase tijekom 3 tjedna razgradnje.

U 4 tjednu enzimske razgradnje vidljivo je sniženje vrijednosti promjene mase što se može objasniti smanjenjem aktivnosti enzima lipaze. Usporedbom vrijednosti gubitka mase čistih komponenata i njihovih mješavina uočava se veći gubitak mase, odnosno manja brzina razgradnja kod PCL/BW mješavina što je rezultat preferiranog smještanja BW faze na površini.

Postotna promjena mase kroz 840 sati enzimske razgradnje u lipazi je relativno malena, no nije zanemariva. Vrijednost promjene mase nakon 840 sati razgradnje u prisutnosti enzima lipaze iznosi oko 3,5 % za PCL i 1,1 % za BW. Iako je brzina razgradnje relativno mala, očito je da PCL polimer značajno doprinosi promjeni brzine razgradnje PCL/BW mješavina.

Najznačajnija promjena mase uočljiva je kod PCL-a i PCL/BW mješavine sastava 70/30. Enzim lipaze uspješno razgrađuje čiste komponente PCL i BW kao i njihove mješavine.



Slika 45. Gubitak mase PCL/BW mješavina različitoga sastava nakon 5 tjedana enzimske razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea*

Brža razgradnja ukazuje na povećanje hidrofilnosti uzorka, odnosno otopina enzima lipaze lakše prodiru kroz čitav presjek uzorka. Kod PCL polimera hidrofilne molekule enzima teško prodiru u unutrašnjost hidrofobnog polimernog uzorka pa se razgradnja uglavnom odvija na površini mehanizmom površinske erozije. Porast brzine razgradnje vidljiv je kod svih uzoraka nakon 3 tjedana u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea*, a potom brzina razgradnje je u blagom opadanju, slika 45.

Ispitne pločice PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina starene u otopini enzima lipaze *Candida cylindracea*, nakon 5 tjedana enzimske razgradnje prikazane su na slici 46.



Slika 46. Pločica PCL, BW i PCL/BW mješavina nakon 5 tjedana enzimske razgradnje

4.2. Karakterizacija površine

4.2.1. Slobodna energija površine i parametri adhezije PCL i PCL/BW mješavina

Procjena adhezije na međupovršini komponenta 1 / komponenta 2, u ovome slučaju PCL/BW, jest proračun parametara adhezije binarnih sustava: slobodne međupovršinske energije (γ_{12}), termodinamičkog rada adhezije (W_{12}) i koeficijenta razlijevanja (S_{12}). Brojni čimbenici utječu na svojstva višefaznih sustava, od kojih i prisutnost interakcija na međupovršini dvaju komponentata. Tijekom promatranja višefaznih sustava od izuzetne važnosti su veličina površine kontakta, jednolikost raspodjele čestica i morfologija mješavine.

4.2.2. Mjerenje kontaktnog kuta vodom i dijodometanom

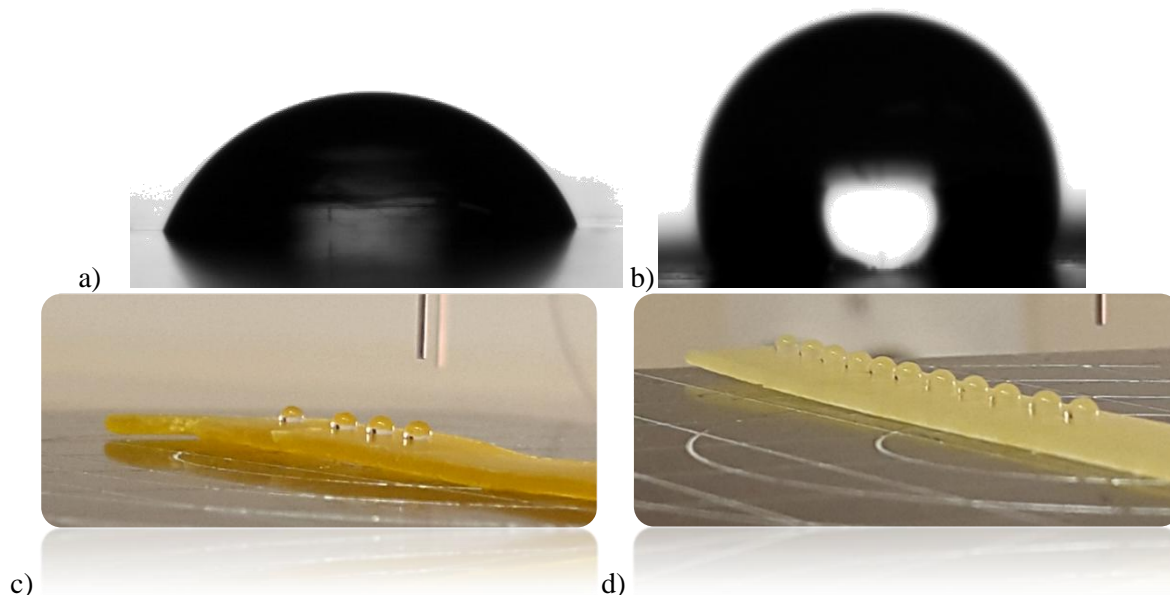
Slobodna energija površine komponentata istraživanih mješavina određena je mjerenjem kontaktnog kuta ispitnim kapljevina vodom i dijodometanom na ispitnoj pločici. Dobiveni podaci su aritmetička sredina provedenih 5 do 10 mjerenja. Mjerenja su provedena na goniometru, a kao ispitne kapljevine korištene su redestilirana voda i dijodometan. U tablici 7 dane su vrijednosti kontaktnog kuta čistih komponentata poli(ϵ -kapolaktona) (PCL) i pčelinjeg voska (BW) te njihovih mješavina.

Tablica 7. Vrijednosti kontaktnog kuta za čiste komponente PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina mjerene ispitnim kapljevina vodom i dijodometanom

Uzorak	Kontaktni kut /°	
	voda	dijodometan
PCL/BW 100/0	78,1 ± 0,5	41,5 ± 0,5
PCL/BW 70/30	98,2 ± 0,5	57,6 ± 0,9
PCL/BW 50/50	102,8 ± 0,7	56,4 ± 0,5
PCL/BW 0/100	105,0 ± 1,0	52,8 ± 1,0

Na temelju eksperimentalno dobivenih vrijednosti kontaktnog kuta vidljivo je da znatno veće vrijednosti kontaktnog kuta, s obje ispitne kapljevine, pokazuje pčeljinji vosak. Niže vrijednosti kontaktnog kuta kod PCL polimera ukazuju na značajnija međudjelovanja na međupovršini s ispitnim kapljevina. Visoke vrijednosti kontaktnog kuta vode na PCL i BW površini govore o hidrofobnosti komponenata.

Vrijednosti kontaktnog kuta PCL/BW mješavina sastava 70/30 i 50/50 su veće u odnosu na vrijednost kontaktnog kuta čistog PCL polimera. Visoke vrijednosti kontaktnog kuta mješavina PCL i BW s vodom ukazuju na visoku hidrofobnost površina, što ima za posljedicu nisku polarnost, točnije nisku vrijednost polarne komponente energije površine.



Slika 47. Kapljice vode na površini PCL (a) i BW polimera (b, c), i prikaz ispitne pločice PCL/BW mješavine 50/50 (d)

Dobivene eksperimentalne vrijednosti kontaktnog kuta s navedenim ispitnim kapljevina poslužile su za proračun površinske energije pojedine komponente, tj. PCL-a i BW-a. Za proračun slobodne površinske energije korišteni su dvoparametarski modeli, Owens-Wendtov i Wuov model. Vrijednost ukupne slobodne energije površine predstavlja

geometrijsku sredinu disperzijske i polarne komponente energije površine prema Owens-Wendtovom modelu odnosno harmonijske sredine prema Wuovom modelu, tablica 8.

Tablica 8. Vrijednosti disperzijske i polarne komponente slobodne površinske energije i ukupne slobodne površinske energije mješavina PCL polimera i pčelinjeg voska(BW) prema Owens-Wendt i Wu modelu

Uzorak	Slobodna površinska energija, mJ m ⁻²					
	Owens-Wendt			Wu		
	γ^d	γ^p	γ	γ^d	γ^p	γ
PCL/BW 100/0	38,83	4,29	43,12	39,45	9,35	48,80
PCL/BW 70/30	29,94	0,63	30,57	31,65	2,84	34,49
PCL/BW 50/50	30,63	0,12	30,76	32,24	1,20	33,44
PCL/BW 0/100	32,71	0,00	32,71	32,59	0,44	33,03

Vrijednosti slobodne površinske energije dobivene primjenom Owens-Wendtova modela niže su od vrijednosti dobivenih primjenom Wuova modela, tablica 8. Dobivene vrijednosti slobodne površinske energije prema oba modela, niske su što je karakteristično za polimere, ne samo za PCL već i za BW. Niska vrijednost energije površine za pčelinji vosak (BW) posljedica je prisutnosti kratkih nepolarnih ugljikovodičnih lanaca, čineći izrazito kompleksnu i hidrofobnu prirodu materijala. PCL polimer karakterizira niska vrijednost polarne komponente slobodne površinske energije što je posljedica kemijske strukture, to jest prisutnosti nepolarnih skupina u lancu polimerne molekule. Kod BW vrijednost disperzijske komponente površinske energije je manja od vrijednosti disperzijske komponente energije površine za PCL polimer, dok vrijednost polarne komponente slobodne površinske energije iznosi 0.

Kao i za čiste komponente, mješavine pokazuju znatno niže vrijednosti slobodne površinske energije primjenom Owens-Wendtova modela od vrijednosti slobodne površinske energije dobivene Wuovim modelom, tablica 8. Vrijednosti polarne komponente slobodne energije površine kod mješavina PCL i BW se jako smanjuju u odnosu na čisti PCL polimer. Možemo zaključiti da se dodatkom i male količine pčelinjeg voska PCL polimeru, značajno povećava hidrofobnost površine mješavina PCL/BW, odnosno njihova polarnost se smanjuje. Vrijednosti ukupne slobodne energije površine za mješavine PCL/BW su niže ili više od vrijednosti ukupne slobodne energije površine za PCL ili BW.

Poznavanje jakosti interakcija na međupovršini jedan je od bitnih čimbenika koji utiče na svojstva mješavina. Kako bi se procijenile interakcije odnosno adhezija između faza mješavine proveden je proračun parametara adhezije binarnog sustava PCL/BW.

Termodinamički parametri adhezije su slobodna energija međupovršine (γ_{SL}), termodinamički rad adhezije (W_A) i koeficijent razlijevanja (S). Proračun parametara adhezije

za binarni sustav PCL/BW temelji se na poznavanju vrijednosti površinskih energija komponenata sustava proračunatih prema Owens-Wendtovom i Wuovom modelu. Termodinamički parametri adhezije mješavine PCL/BW izračunati prema navedenim dvoparametarskim modelima dani su u tablici 9.

Tablica 9. Vrijednosti parametara adhezije međupovršinske slobodne energije površine γ_{SL} , termodinamički rad adhezije W_A i koeficijent kvašenja S mješavine PCL/BW

Par komponentata mješavine	Owens-Wendt model			Wu model		
	γ_{SL} , mJ m ⁻²	W_A , mJ m ⁻²	S	γ_{SL} , mJ m ⁻²	W_A , mJm ⁻²	S
PCL/BW	4,55	71,28	5,86	8,76	73,07	7,01

Poznavanje vrijednosti parametara adhezije omogućava procjenu međudjelovanja na međupovršini. Optimalna adhezija se postiže ukoliko je zadovoljen uvjet minimalne slobodne energije međupovršine, maksimalnog termodinamičkog rada adhezije i vrijednosti koeficijenta razlijevanja većeg od nule.

Vidljivo je da se vrijednosti termodinamičkih parametara adhezije proračunatih prema Owens-Wendtovom i Wuovom modelu razlikuju. Veće vrijednosti parametara adhezije prema modelu harmonijske sredine proizlaze iz većih vrijednosti slobodne energije površine komponenata mješavine. Slobodna energija međupovršine je manja što je adhezija između komponenata veća. Značajna adhezija se očekuje ukoliko međupovršinska energija teži nuli. Stoga, niska vrijednost slobodne međupovršinske energije (γ_{SL}) mješavine polimera i pčelinjeg voska ukazuje na prisutnost interakcija na međupovršini PCL/BW. Pozitivne vrijednosti (veće od 0) koeficijenta razlijevanja znače dobro vlaženje površine PCL faze BW fazom.

4.2.3. Kontaktni kut s vodom – nakon enzimske razgradnje

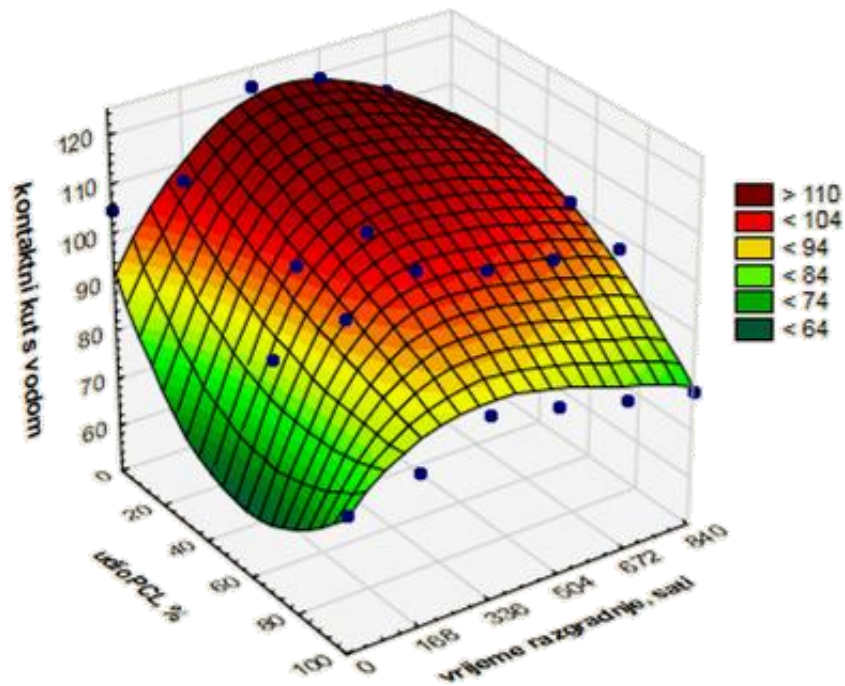
Karakteristike površine mješavina PCL i BW različitog sastava prije i nakon različitih vremena razgradnje u Hankovoj puferiranoj otopini soli s enzimom lipazom određene su mjerenjem kontaktnog kuta. Kontaktni kut mjeren je s vodom kao ispitnom kapljevnom poznate vrijednosti slobodne energije površine. Određivanjem vrijednosti kontaktnog kuta čistih komponenata poli(ϵ -kaprolaktona) i pčelinjeg voska te njihovih mješavina s ispitnom kapljevnom vodom praćena je promjena hidrofilnosti površine PCL polimera i mješavina PCL/BW prije i nakon enzimske razgradnje.

Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom na površini čistih komponenata PCL-a i BW-a prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje dani su u tablici 10.

Tablica 10. Vrijednosti kontaktnog kuta PCL i BW mjerenih ispitnom kapljevnom vodom prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Enzim	Uzorak	Vrijeme razgradnje, sati	Kontaktni kut /°	
			voda	
Lipaza <i>Candida cylindracea</i>	PCL	0	78,1 ± 0,5	
	BW	0	105,0 ± 1,0	
	PCL	168	81,3 ± 0,6	
	PCL	336	88,0 ± 0,9	
	PCL	504	84,7 ± 0,4	
	PCL	672	80,8 ± 0,9	
	PCL	840	78,00 ± 1,4	
	BW	168	106,8 ± 0,6	
	BW	336	121,4 ± 1,0	
	BW	504	119,3 ± 0,4	
	BW	672	112,5 ± 0,7	
	BW	840	102,5 ± 1,1	
	Lipaza <i>Thermomyces lanuginosus</i>	PCL	168	111,8 ± 0,9
		PCL	336	90,0 ± 1,7
BW		168	124,1 ± 1,0	
BW		336	113,3 ± 1,0	

Vrijednosti kontaktnog kuta s vodom na površini PCL polimera prije enzimske razgradnje iznosi 78,1° što ukazuje na hidrofobnost površine polimera. Izazito hidrofoban karakter pokazuje druga komponenta, pčelinji vosak (BW), čiji kontaktni kut s vodom iznosi 105,0°. Hidrofobnost PCL polimera i BW je posljedica njihove kemijske strukture. Kod PCL polimera monomerne jedinice polimerne molekule sastoje se od pet $-CH_2$ skupina koje su hidrofobne prirode. Pčelinji vosak je složena smjesa zasićenih i nezasićenih linearnih ugljikovodika koji su uzrok niske polaranosti tj. hidrofobnosti materijala. Različite površinske karakteristike PCL i BW uvjetovanih hidrolitičkom razgradnjom prikazani su na slici 48.



Slika 48. Ovisnost kontaktnog kuta s vodom o vremena hidrolitičke razgradnje PCL/BW mješavina različitog sastava u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* nakon: a) 168 h, b) 336 h, c) 504 h, d) 672 h, e) 840 h

Vrijednosti kontaktnog kuta s vodom na površini PCL polimera povećavaju se nakon prvog i drugog tjedna (168 i 336 sati) enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*. Može se pretpostaviti da je povećanje vrijednosti kontaktnog kuta s vodom na površini PCL polimera posljedica nastale poroznije strukture na površini. Također, može se zaključiti da se razgradnja uslijed djelovanja lipaze na PCL polimer i BW odvija mehanizmom površinske erozije.

Mjerenje kontaktnog kuta s vodom na površini PCL i BW provedeno je prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje u otopini lipaze, tablica 10. Vrijednosti kontaktnog kuta čistih komponenta nakon 168 i 336 sati razgradnje upućuju na velike vrijednosti kuta, što je posljedica djelovanja enzima, odnosno narušene strukture uzorka. Usporednom vrijednosti kontaktnog kuta s vodom navedenih uzorka u istom vremenskom intervalu (2 tjedna) u otopini lipaze *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*, uočavaju se velike razlike u vrijednostima. Tako dobivene vrijednosti govore o aktivnosti i uspješnom djelovanju enzima na razgradnju PCL i BW komponente. Dakle, mehanizam razgradnje PCL i BW te mješavina PCL/BW odvija se mehanizmom površinske erozije što je potvrđeno djelovanjem lipaze *Thermomyces lanuginosus* znatno veće aktivnosti, u kraćem vremenskom intervalu.

Daljnijim djelovanjem enzima lipaze na PCL polimer vidljivo je smanjenje vrijednosti kontaktnog kuta što rezultira hidrofilnijom površinom. Na temelju FTIR-ATR analize površine PCL polimera nakon 504 sata enzimske razgradnje utvrđena prisutnost –OH skupina, već prisutnost amino skupina. Na temelju navedenog može se pretpostaviti da je povećanje hidrofilnosti uzorka posljedica adsorpcije enzima na površinu s obzirom da jedino enzim lipaze

sadrži amino skupine u istraživanom sustavu. Vrijednost kontaktnog kuta PCL polimera nakon 5 tjedana enzimske razgradnje postiže vrijednost kontaktnog kuta gotovo jednaku kao i prije početka razgradnje.

Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom na površini BW-a dani su tablici 10., iz kojih je vidljiv porast vrijednosti kontaktnog kuta nakon 168 i 336 sati enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze. Hidrofobnost uzorka BW nakon odgovarajućeg vremena razgradnje značajnije se smanjila pa se može pretpostaviti da je kod duljeg vremena enzimske razgradnje nastala poroznija struktura na površini. Površina uzorka analizirana je infracrvenom spektroskopijom kojom je utvrđena prisutnost –NH skupina na površini BW uzorka koja doprinosi povećanju hidrofilnosti uzorka. Povećanje hidrofilnosti površine BW posljedica je i adsorpcije enzima na površinu uzorka što je utvrđeno analizom površine FTIR-ATR metodom.

Tablica 11. Vrijednosti kontaktnog kuta PCL i BW mješavina mjerenih ispitnom kapljevinom vodom prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Enzim	Uzorak PCL/BW	Vrijeme razgradnje, sati	Kontaktni kut /°	
			voda	
Lipaza <i>Candida cylindracea</i>	70/30	0	98,2 ± 0,5	
	50/50	0	102,8 ± 0,7	
	70/30	168	101,2 ± 0,3	
	70/30	336	106,5 ± 0,5	
	70/30	504	102,0 ± 0,9	
	70/30	672	99,3 ± 0,6	
	70/30	840	97,4 ± 1,0	
	50/50	168	105,3 ± 1,1	
	50/50	336	107,4 ± 0,3	
	50/50	504	103,2 ± 0,4	
	50/50	672	102,6 ± 0,8	
	50/50	840	100,3 ± 1,4	
	Lipaza <i>Thermomyces lanuginosus</i>	70/30	168	102,7 ± 0,5
		70/30	336	101,5 ± 1,1
50/50		168	105,5 ± 0,2	
50/50		336	104,8 ± 0,7	

Vrijednosti kontaktnog kuta s vodom na površini PCL/BW mješavina tijekom enzimske razgradnje lipazom povećavaju se nakon 1. i 2. tjedna te se postupno smanjuju s duljim vremenom enzimske razgradnje, tablica 11. Razgradnja mješavina u HBSS otopini lipaze

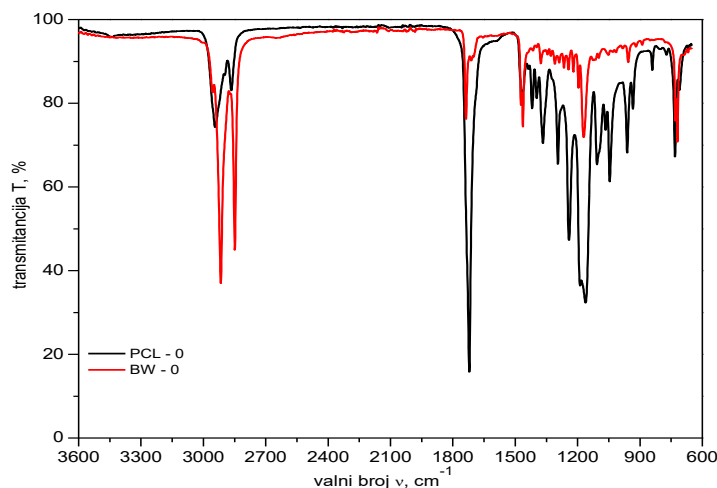
rezultira manje hidrofobnom površinom. Dodatkom pčelinjeg voska (BW) PCL polimeru značajno se smanjuje vlaženje i povećava kontaktni kut. Vrijednost kontaktnog kuta s vodom na površini čistog PCL polimera prije razgradnje iznosi $78,1^\circ$ te dodatkom 30 % BW vrijednost kontaktnog kuta mješavine PCL i BW sastava 70/30 iznosi $98,2^\circ$, što ukazuje na hidrofobnost površine tj. nisku energiju površine i preferirano smještanje BW faze na površini.

Hidrofilnost uzoraka PCL/BW mješavina nakon enzimske razgradnje se povećala što je vidljivo iz smanjenja vrijednosti kontaktnog kuta. Značajna promjena površinskih karakteristika najuočljivija je kod PCL/BW mješavine sastava 50/50, kod koje osim značajnog smanjenja vrijednosti kontaktnog kuta tijekom vremena enzimske razgradnje, najizraženija je i hrapavost površine. Tijekom mjerenja kontaktnog kuta primjećen je prodor kapljice vode u poroznu strukturu mješavine što je posljedica nehomogene razgradnje mješavine. Brzina razgradnje PCL i BW faze mješavine ne odvija se jednakom brzinom što je rezultiralo nastajanjem šupljine na mjestu gdje se nalazila PCL faza.

4.2.4. Rezultati FTIR-ATR analize

Primjenom FTIR-ATR spektroskopije praćene su strukturne promjene PCL polimera i BW te njihovih mješavina u omjeru PCL/BW 70/30 i 50/50 tijekom 5 tjedana enzimske razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea*. Također, praćene su promjene u strukturi navedenih uzoraka kroz 2 tjedna razgradnje u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*. Promjene u strukturi polimera poli(ϵ -kaprolaktona) i pčelinjeg voska i njihovih mješavina određene su prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje.

Na slici 49 prikazan je usporedni FTIR-ATR spektar čistih komponenata PCL (0) i BW (0) prije enzimske razgradnje. Usporedni FTIR-ATR spektri PCL polimera i BW te mješavina PCL i BW prije i nakon 168, 336, 504, 672 i 840 sati enzimske razgradnje u HBSS otopini prikazani su na slikama 50-54. 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 μm , odnosno da se ovdje izneseni rezultati odnose na spektroskopske analizu površine do dubine od 2,0 μm .



Slika 49. FTIR-ATR spektar PCL polimera i pčelinjeg voska (BW) prije enzimske razgradnje

Na spektru PCL polimera prije izlaganja djelovanju enzima vidljive su karakteristične apsorpcijske vrpce dugačkih alkilnih lanaca u području 2950 cm^{-1} , 2916 cm^{-1} , 2857 cm^{-1} , 1475 cm^{-1} i 715 cm^{-1} . Navedeni valni brojevi odgovaraju vibracijama CH_2 istezanja.

Na spektru BW uočavaju se apsorpcijske vrpce u području 2916 cm^{-1} , 2848 cm^{-1} , 1463 cm^{-1} i 719 cm^{-1} koje su rezultat asimetričnih i simetričnih vibracija istezanja CH_2 skupina u linearnim ugljikovodičnim lancima pčelinjeg voska. Intenzivnost u području oko 2916 cm^{-1} je znatno izraženija kod BW u odnosu na PCL polimer, dok pri nižim vrijednostima valnih brojeva apsorpcijske vrpce PCL polimera su izraženije i razdvojenije. Rezultat preklapanja apsorpcijskih vrpce kod BW je posljedica iznimno složene kemijske strukture uzorka.

Apsorpcijska vrpca PCL polimera najveće intenzivnosti je vrpca na 1720 cm^{-1} , koja odgovara karbonilnoj skupini, slika 50. Karbonilna skupina PCL polimera se sastoji od dvije razdvojene vrpce koje se preklapaju, i njena intenzivnost je najizraženija. Kod PCL polimera, pri vrijednosti valnog broja 1737 cm^{-1} smještena je relativno široka, a oštrija i intenzivnija vrpca karbonilne skupine smještena je na 1724 cm^{-1} . Prema literaturi valni broj 1737 cm^{-1} i 1724 cm^{-1} pripisuje se amorfnim i pravilnim kristalnim područjima polimera. Zbog manjeg stupnja središtenosti, amorfnja vrpca je relativno široka i karbonilna skupina se može smjestiti u amorfnoj fazi. U kristalnoj fazi zbog većeg stupnja središtenosti, manja je mogućnost smještanja karbonilne skupine i zato se uočava oštriji pik. Razlog većeg stupnja središtenosti strukture u kristalnoj fazi jesu i djelovanja intermolekularnih i intramolekularnih sila. Posljedica pomicanja vrpce prema nižim vrijednostima valnih brojeva je rezultat djelovanja sila koje utječu na dipolni moment karboksilnih skupina vezanih za kristalne lamele.^{42,43}

Budući da je pčelinji vosak složena smjesa zasićenih i nezasićenih ugljikovodika, složenih monoestera, slobodnih masnih kiselina i slobodnih alkohola postojanje preklapanja apsorpcijskih vrpce je neizbježno, stoga su izdvojene samo najznačajnije. Kod pčelinjeg voska osim dominantnih alifatskih ugljikovodika (2916 , 2848 , 1463 , 719 cm^{-1}), najznačajnije apsorpcijske vrpce su pri vrijednosti 1736 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} i 1162 cm^{-1} . Prema literaturi te eksperimentalno dobivenoj vrijednosti 1736 cm^{-1} pripisuje se vibracijskoj komponenti ($\text{C}=\text{O}$) istezanja odnosno esterima aromatske karboksilne kiseline s alkoholima, 1260 cm^{-1} vibracijama $\text{C}-\text{O}-\text{C}'$ istezanja u molekulama etera, dok se alifatski ugljikovodici uz prisutnost heterocikličkih spojeva mogu uočiti na 1172 cm^{-1} . Područje od 1320 do 1210 cm^{-1} odgovara vibracijama defomacije $\text{C}-\text{O}$ i $\text{O}-\text{H}$ skupina prisutnih kiselina, a $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ vibracijama $\text{C}-\text{O}$ veza u alkoholima i esterima, prema literaturi. U području od 1500 do 1200 cm^{-1} pojavljuje se nekoliko vrpce većeg intenziteta (1463 , 1389 , 1230 cm^{-1}) i one se pripisuju vibracijama savijanja CH_3 skupina te simetričnom istezanju $\text{C}-\text{O}$ veza estera.⁴⁴ Također, vidljivo je da porastom udjela BW komponente u PCL/BW mješavinama rezultira porastom broja vrpce manje intenzivnosti u području $1800-900\text{ cm}^{-1}$.

Osim vibracija CH_2 istezanja, javljaju se i vibracije istezanja $\text{C}-\text{H}$ (CH_3) i savijanja $\text{C}-\text{H}$ kod čistih komponenta PCL-a i BW-a. Na spektru PCL polimera prije hidrolitičke razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze vidljive su apsorpcijske vrpce kod 1270 cm^{-1} i $1213-1186\text{ cm}^{-1}$, koje su prema literaturi poznate kao vrpce kristalita u strukturi polimera. vrpce kristalita pri navedenim valnim brojevima redom odgovaraju vibracijama $\text{C}-\text{COO}$ istezanja, $\text{O}-\text{CH}$ istezanja,

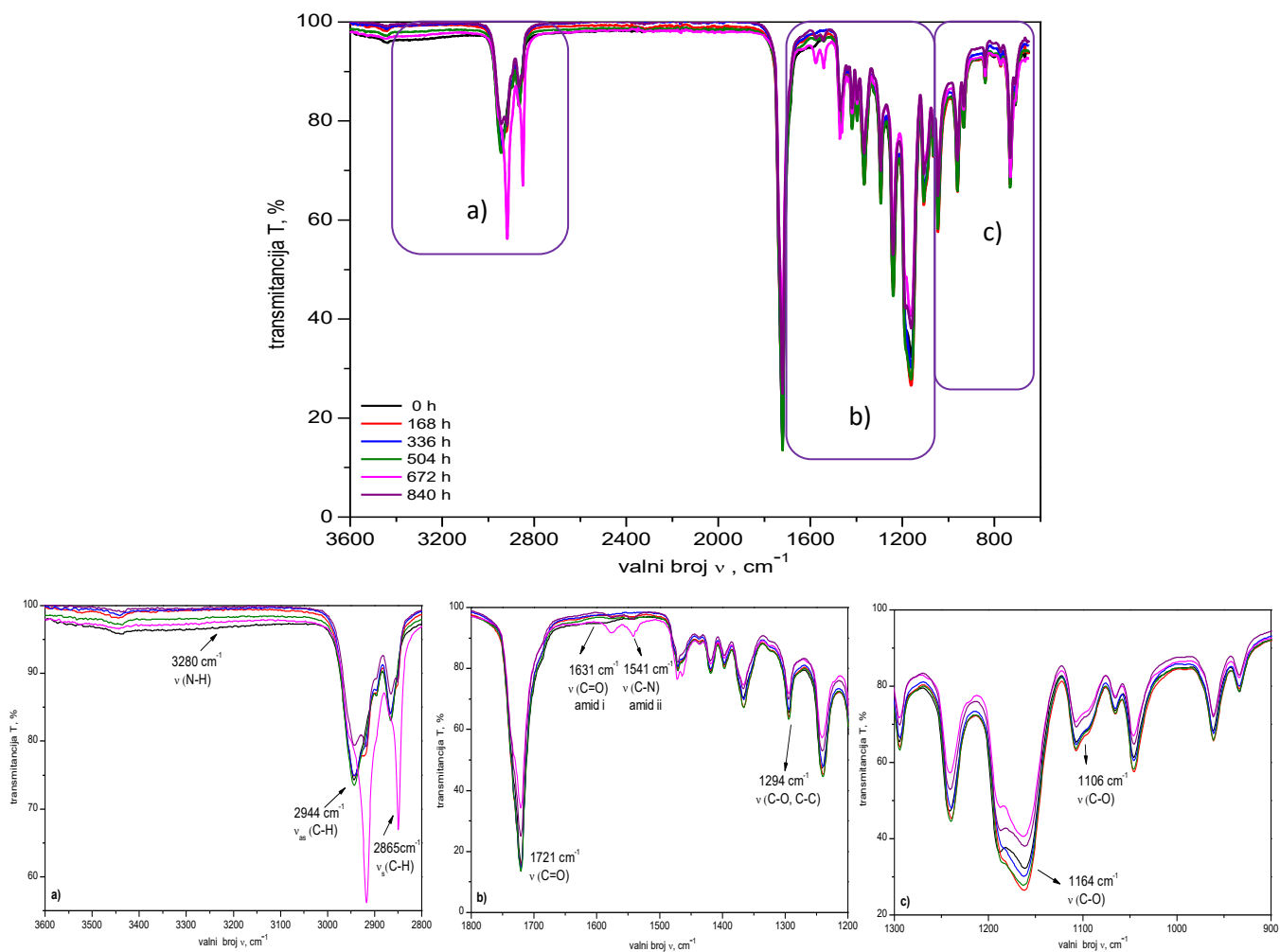
CH₃ i C-H savijanja. Valni brojevi u području od 1240 (1241-1243 cm⁻¹) do 1200 cm⁻¹ pripisuju se kristalnoj strukturi polimera. Ovisno o načinu pripreme uzorka, molekulskoj masi i drugim čimbenicima može se očekivati manji pomak vrpce.⁴²

U analizi FTIR-ATR spektra područje od interesa nalazi se između 1800 i 800 cm⁻¹, gdje su smještene esterske i metilne skupine PCL polimera i BW. Područje od 1800 do 800 cm⁻¹ naziva se još i područjem „otiska prsta“. Na spektru PCL polimera vidljive su jake apsorpcijske vrpce između 1721 i 1106 cm⁻¹, koje se pripisuju simetričnom istezanju C=O i C-O skupina esterske veze. Kod pčelinjeg voska (BW) vibracije istezanja veza estera i masnih kiselina su u području 1765-1739 cm⁻¹ s apsorpcijskim maksimumom pri 1739 cm⁻¹, etera od 1300 do 1130 cm⁻¹ s apsorpcijskim maksimumom na valnom broju 1172 cm⁻¹ i metilnih skupina na 719 cm⁻¹.

Usljed djelovanja vode na materijal može doći do stvaranja vodikove veze ili pomaka esterske veze prema nižim frekvencijama zbog nukleofilnog napada molekulama vode. Rezultati pokazuju da se karbonilna skupina (C=O) esterske veze ne pomiče.

Na vrpce karboksilne skupine vidljivo je sniženje intenzivnosti s porastom vremena razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze. Promjene u intenzivnosti mogu biti posljedica hidrolize polimernih lanaca uslijed vibracija istezanja. Promjene u strukturi PCL-a, BW-a i mješavina PCL/BW zbog hidrolize i apsorpcije vode uočavaju se kod vrpce u području 1451-1455 cm⁻¹, 1381-1383 cm⁻¹, 1264-1267 cm⁻¹, 1180-1181 cm⁻¹, 1127-1129 cm⁻¹, 1080-1083 cm⁻¹, 956-960 cm⁻¹, 920 cm⁻¹. Promatranjem spektra čistih komponenata i mješavina PCL/BW uočljiva je vrpca pri 1444 cm⁻¹ koja se pripisuje asimetričnom istezanju metilne -CH₃ skupine, dok vrpce u području 1470-1472 cm⁻¹ se pripisuju simetričnim savijanjima -CH₃ skupine.

Na slikama 50-53. prikazani su FTIR-ATR spektri PCL/BW mješavina nakon različitih vremena enzimske razgradnje (1. - 5. tjedna) razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea*. Na slici 54. prikazan je spektar mješavina PCL-a i BW-a starenih u HBSS otopini s lipazom *Thermomyces lanuginosus* kroz 2 tjedna.



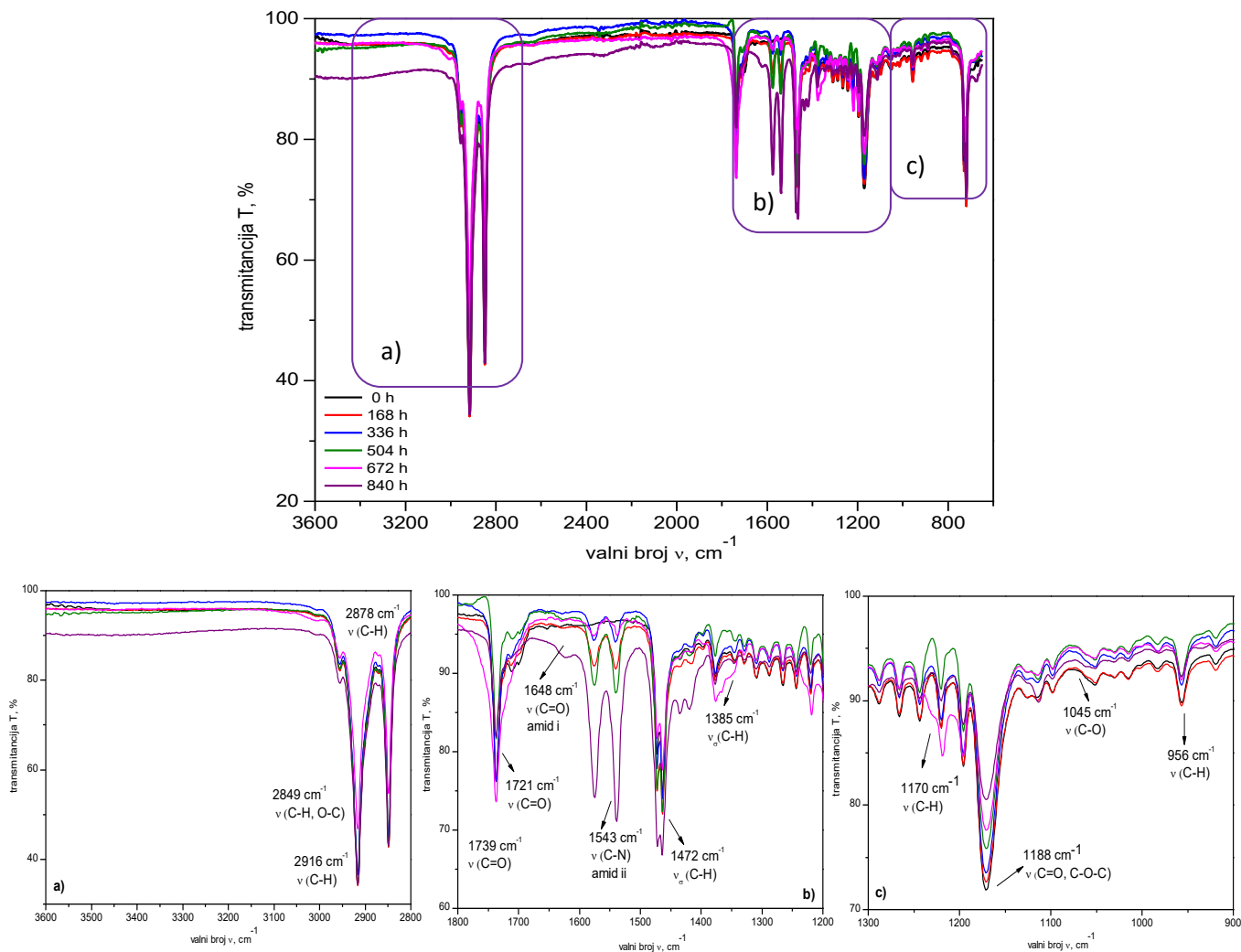
Slika 50. FTIR-ATR spektri PCL polimera nakon različitih vremena enzimske razgradnje

(1. - 5. tjedna) razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze

a) područje valnih brojeva 3600 cm⁻¹ – 2800 cm⁻¹

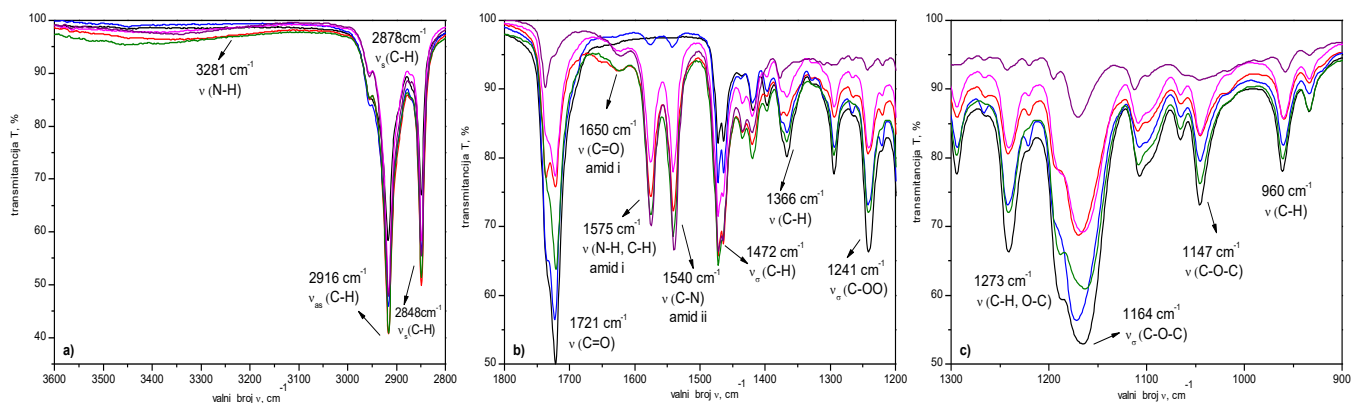
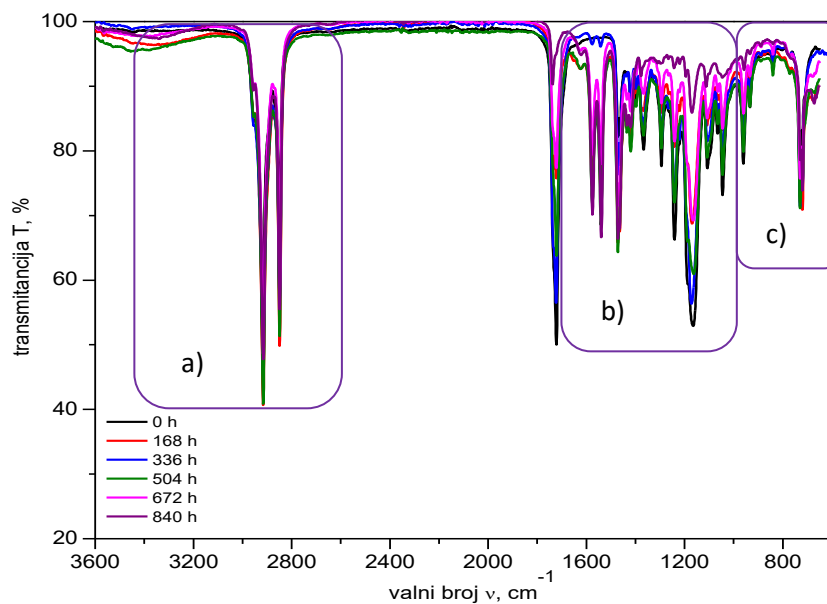
b) područje valnih brojeva 1800 cm⁻¹ – 1200 cm⁻¹

c) područje valnih brojeva 1300 cm⁻¹ – 900 cm⁻¹



Slika 51. FTIR-ATR spektr pčelinjeg voska (BW) nakon različitih vremena enzimske razgradnje (1. - 5. tjedna) razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze

- područje valnih brojeva 3600 cm⁻¹ – 2800 cm⁻¹
- područje valnih brojeva 1800 cm⁻¹ – 1200 cm⁻¹
- područje valnih brojeva 1300 cm⁻¹ – 900 cm⁻¹

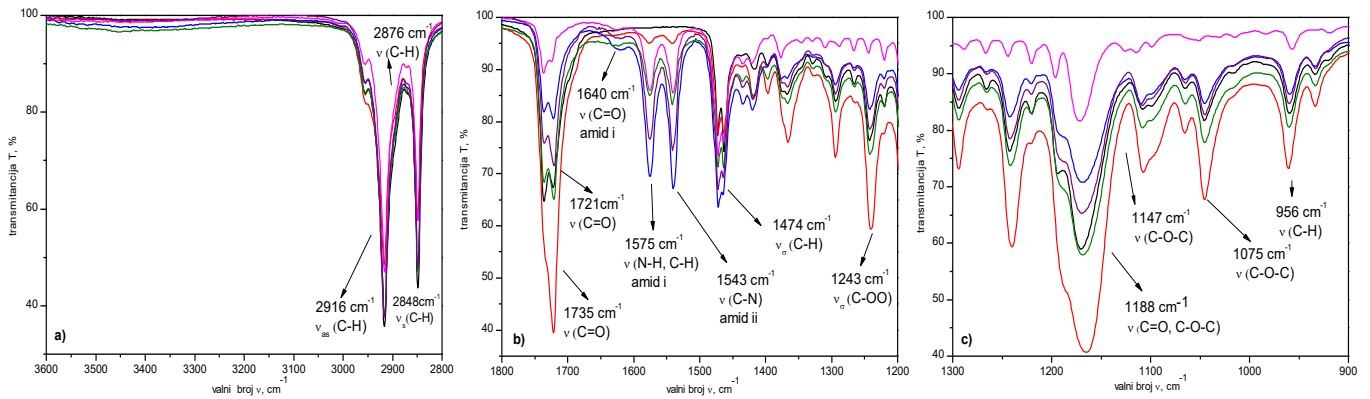
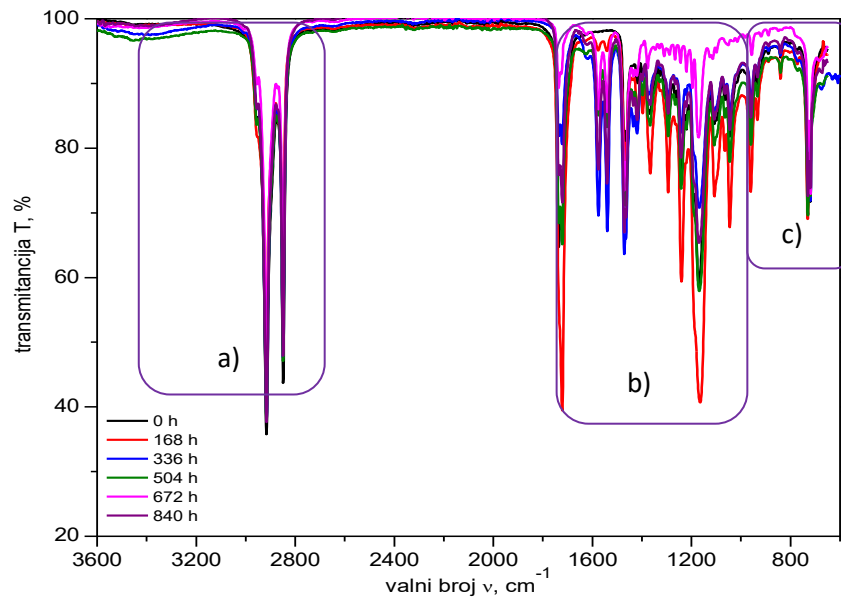


Slika 52. FTIR-ATR spektri PCL/BW mješavine sastava 70 % PCL-a nakon različitih vremena enzimske razgradnje (1. - 5. tjedna) razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze

a) područje valnih brojeva 3600 cm^{-1} – 2800 cm^{-1}

b) područje valnih brojeva 1800 cm^{-1} – 1200 cm^{-1}

c) područje valnih brojeva 1300 cm^{-1} – 900 cm^{-1}

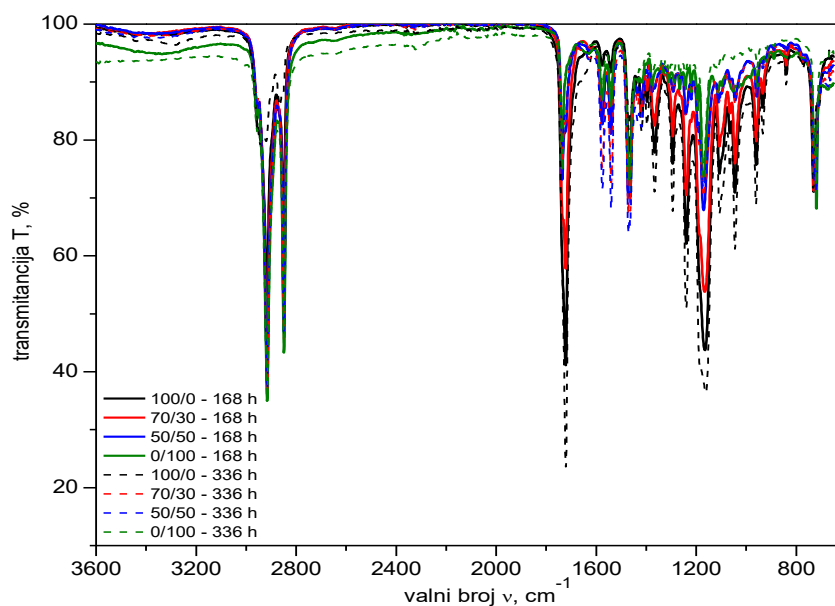


Slika 53. FTIR-ATR spektri PCL/BW mješavine sastava 50 % PCL-a nakon različitih vremena enzimske razgradnje (1. - 5. tjedna) razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze

a) područje valnih brojeva 3600 cm^{-1} – 2800 cm^{-1}

b) područje valnih brojeva 1800 cm^{-1} – 1200 cm^{-1}

c) područje valnih brojeva 1300 cm^{-1} – 900 cm^{-1}



Slika 54. FTIR-ATR spektri PCL-a i BW-a te PCL/BW mješavina nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Na spektru PCL polimera nakon 840 sati (5 tjedana) razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* vidljiva je promjena kod 3200 cm^{-1} . Promjene u na spektrima čistih komponenata PCL i BW te njihovih mješavina već nakon prvog tjedna enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze vidljiva je pojava novih vrpce u području od 1800 do 1500 cm^{-1} , koje se mogu pripisati proteinima prisutnim na površini uzorka. Vrpce koje se javljaju kod vrijednosti valnog broja $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ pripisuju se primarnom amidu (vibracije istezanja C=O skupine), a vrpce $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ sekundarnom amidu (NH veza), što ukazuje na mogućnost adsorpcije lipaze na površinu istraživanih uzoraka tijekom izlaganja enzimskoj razgradnji.⁴⁵ Intenzivnost vrpce raste s vremenom razgradnje, u području „otiska prsta“, osobito kod uzorka BW. Kod pčelinjeg voska porastom vremena enzimske razgradnje javljaju se vrpce veće intenzivnosti u području $1572\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$ koje se pripisuju vibracijama –COO skupina slobodnih kiselina. Nadalje, karakteristične apsorpcijske vrpce u području $1666\text{--}1662\text{ cm}^{-1}$ dobivene analizom površine BW i PCL/BW mješavina pripisuju se sekundarnom amidu, tj. vibracijama C=C veze enzima.

Tijekom 5. tjedana (840 sati) enzimske razgradnje karakteristične apsorpcijske vrpce se znatno mijenjaju kod svih istraživanih uzoraka, kako kod čistih komponenata PCL-a i BW-a tako i kod PCL/BW mješavina različitog sastava. Vidljive promjene uvjetovane su promjenama u strukturi poli(ϵ -kaprolaktona) i pčelinjeg voska uslijed djelovanja enzima lipaze, tj. enzimske razgradnje. Značajne promjene uočavaju se kao promjena u intenzivnosti pojedinih karakterističnih vrpce. Uočava se smanjenje intenzivnosti vrpce 1721 cm^{-1} te povećanje intenzivnosti vrpce kod valnog broja 1653 cm^{-1} i 1542 cm^{-1} s povećanjem vremena enzimske razgradnje PCL-a i PCL/BW mješavina.

Enzimska razgradnja bazira se na djelovanju molekula vode na esterske veze poliestera kao i pčelinjeg voska, BW. Dakle, hidrolitička razgradnja uključuje reakcije cijepanja lanaca na

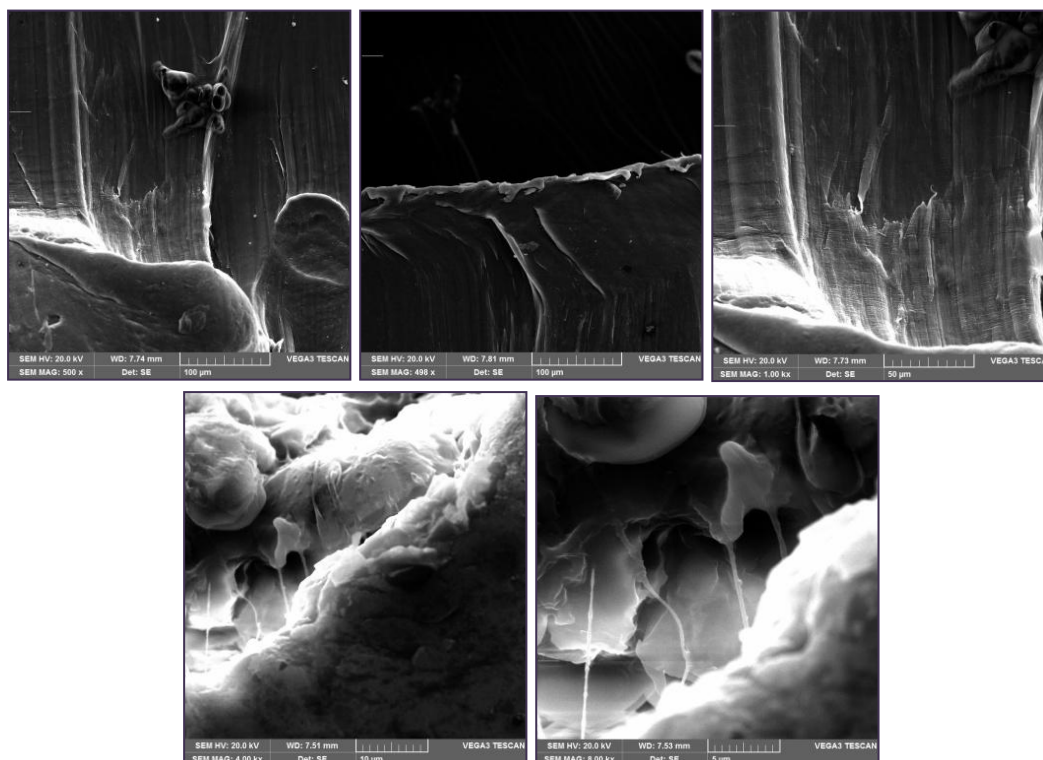
esterskim vezama, a tijekom tog procesa svaka molekula vode "napada" jednu estersku skupinu. Analizom površine FTIR-ATR spektroskopijom su utvrđene značajne promjene u strukturi PCL i PCL/BW mješavina s porastom vremena hidrolitičkog starenja u HBSS otopini enzima lipaze.

4.2.5. Rezultati SEM analize

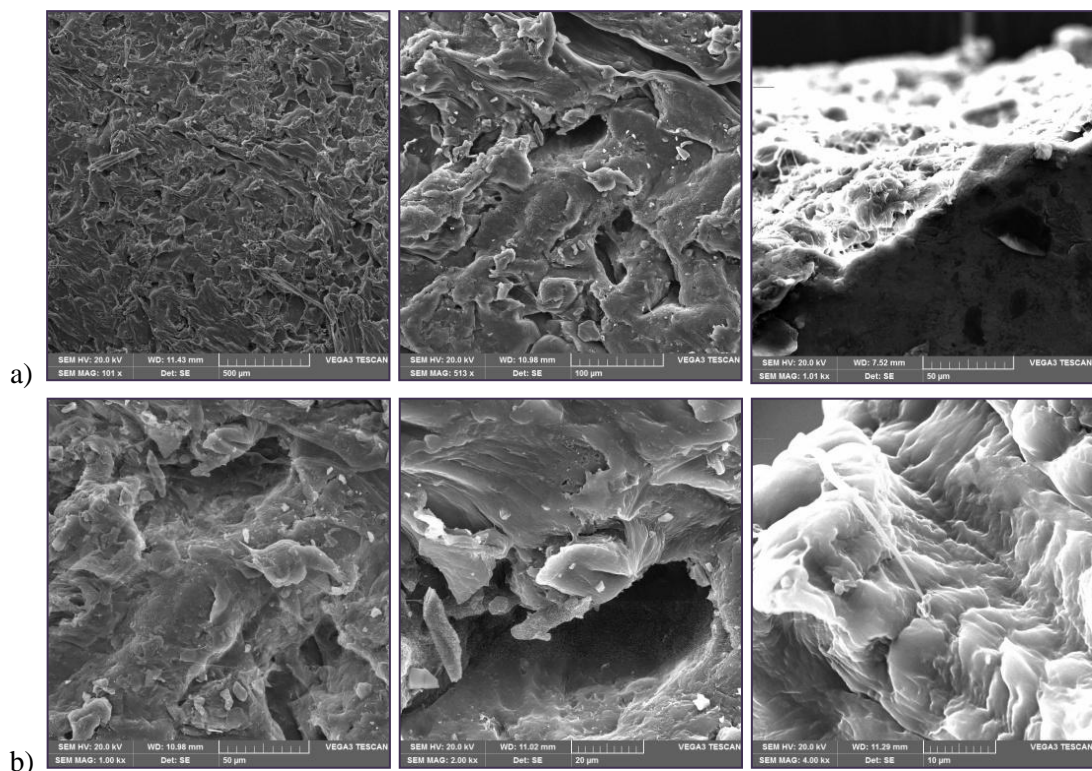
Morfološka struktura PCL polimera i pčelinjeg voska (BW) te PCL/BW mješavina ispitana je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), prije i nakon 5. tjedana razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* te nakon 2. tjedna razgradnje u lipazi *Thermomyces lanuginosus*.

Na slikama 55.- 58. prikazane su SEM mikrofotografije PCL i BW polimera prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje.

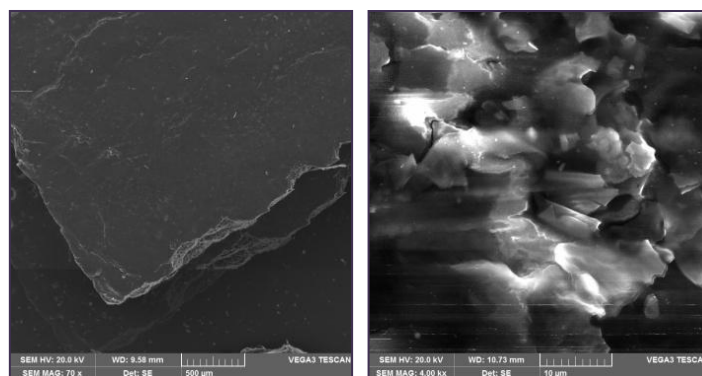
Površina PCL polimera je neravna, iako izgledom djeluje glatka i homogena, a prikazana je na slici 55. Nakon mehaničkog ispitivanja vidljiva je orijentacija makromolekula u smjeru naprezanja, odnosno došlo je do istezanja i usmjeravanja lanaca u smjeru djelovanje vanjske sile i konačnog popuštanja. Kod PCL polimera jasno se uočavaju izradci koji upućuju na popuštanje polimerne matrice smičnim naprezanjem.



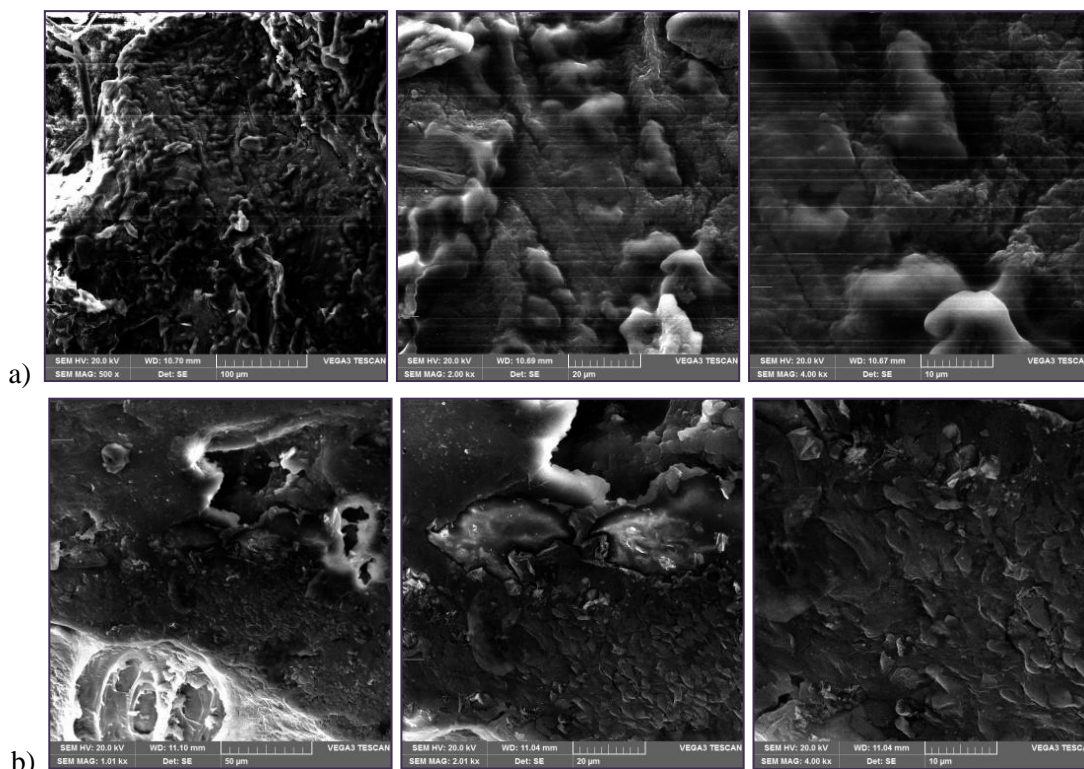
Slika 55. SEM mikrofotografije površine PCL polimera prije početka razgradnje, pri različitim povećanjima



Slika 56. SEM mikrofotografije površine PCL polimera nakon 5 i 2 tjedana enzimske razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracea* (a) i *Thermomyces lanuginosus* (b), pri različitim povećanjima



Slika 57. SEM mikrofotografije površine BW prije početka razgradnje, pri različitim povećanjima

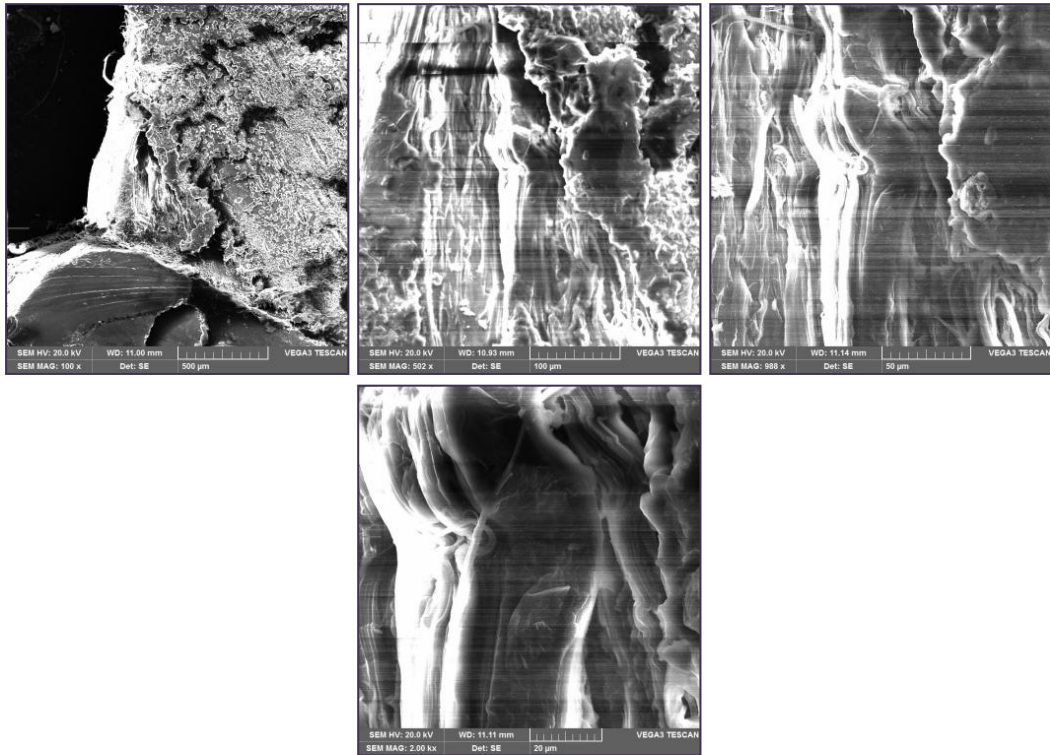


Slika 58. SEM mikrofotografije površine BW nakon 5 i 2 tjedana enzimske razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracea* (a) i *Thermomyces lanuginosus* (b) pri različitim povećanjima

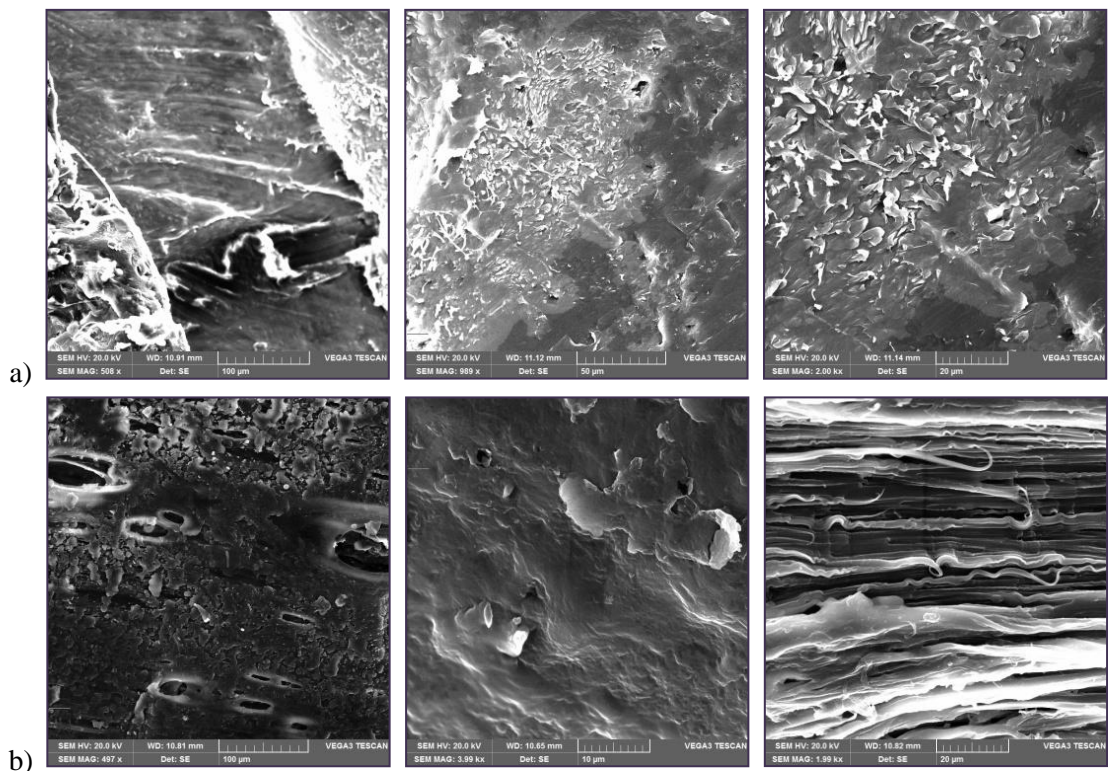
Temeljnim snimljenih SEM mikrofotografija uzoraka PCL i BW polimera nakon enzimske razgradnje u HBSS otopini s lipazom uočava se je vrlo hrapava površina. Osim neravne površine uočavaju se mikropukotine koje predstavljaju slaba mjesta u strukturi oko kojih se koncentriralo naprezanje do konačnog popuštanja.

Na površini PCL i BW polimera nakon enzimske razgradnje jasno je vidljiva sferolitna struktura kristalne faze. Tijekom razgradnje primarno se razgrađuje amorfna faza polimera. Površina PCL i BW polimera je izrazito nagriženena uslijed djelovanja enzima lipaze što ukazuje na razgradnju mehanizmom erozije površine.

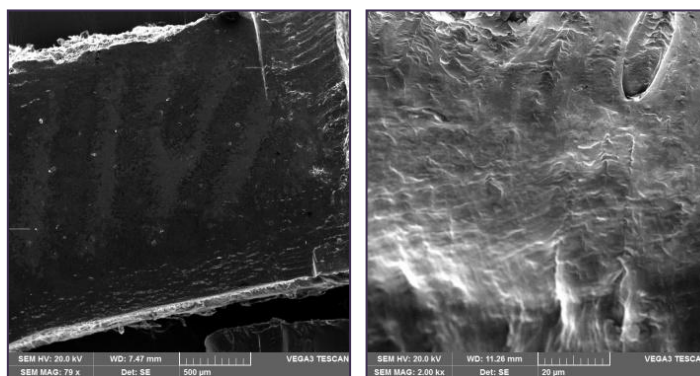
SEM mirografija PCL/BW mješavina sastava 70/30 i 50/50 prije i nakon 5 tjedana razgradnje u lipazi *Candida cylindracea* i enzimske razgradnje u lipazi u *Thermomyces lanuginosus* u vremenu od 2 tjedna prikazane su na slikama 59.-62.



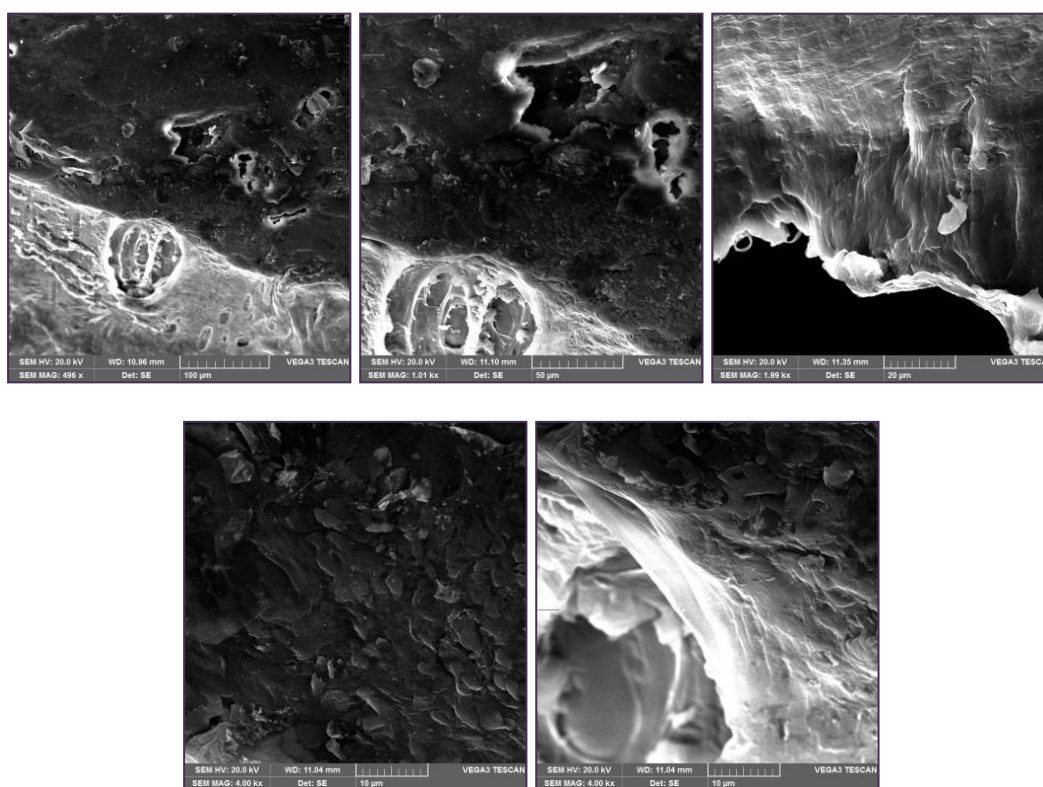
Slika 59. SEM mikrofotografije površine PCL/BW mješavine 70/30 prije početka razgradnje, pri različitim povećanjima



Slika 60. SEM mikrofotografije površine PCL/BW mješavine 70/30 enzimske razgradnje nakon 5 i 2 tjedana u otopini lipaze *Candida cylindracea* (a) i *Thermomyces lanuginosus* (b), pri različitim povećanjima



Slika 61. SEM mikrofotografija površine PCL/BW mješavine 50/50 prije početka razgradnje, pri različitim povećanjima



Slika 62. SEM mikrofotografije površine PCL/BW mješavine 50/50 nakon 2 tjedana enzimske razgradnje u otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*, pri različitim povećanjima

SEM mikrofotografija PCL/BW mješavine sastava 70/30 (slika 59.) ukazuje na relativno finu morfologiju u odnosu na morfologiju mješavine PCL /BW 50/50 (slika 61.), koja je znatno grublja. Takva morfologija ukazuje na nejednoliku raspodjelu BW komponente u PCL matrici, tj. mješljivost u određenom području sastava. Uslijed nejednolike raspodjele BW faze u PCL matrici do popuštanja dolazi na mjestu koncentracije pčelinjeg voska (BW), koji čini mekši dio strukture.

Na SEM mikrofotografijama PCL/BW mješavina 70/30 i 50/50 nakon enzimske razgradnje u HBSS otopini s enzimom lipazom vidljiva je vrlo gruba površina s mikropukotinama. Upravo mikropukotine predstavljaju mjesta popuštanja jer tijekom naprezanja one se šire u šupljine. Zbog nemogućnosti prodiranja enzima u unutrašnjost strukture PCL/BW mješavine uočljiva je samo izrazita narušenost površine. Na površini loma vidljive su nakupine nagrižene površine materijala, a makromolekule PCL polimera zadržavaju početni izgled, slika 59. i 62.

4.3. Toplinska svojstva PCL i PCL/BW mješavina

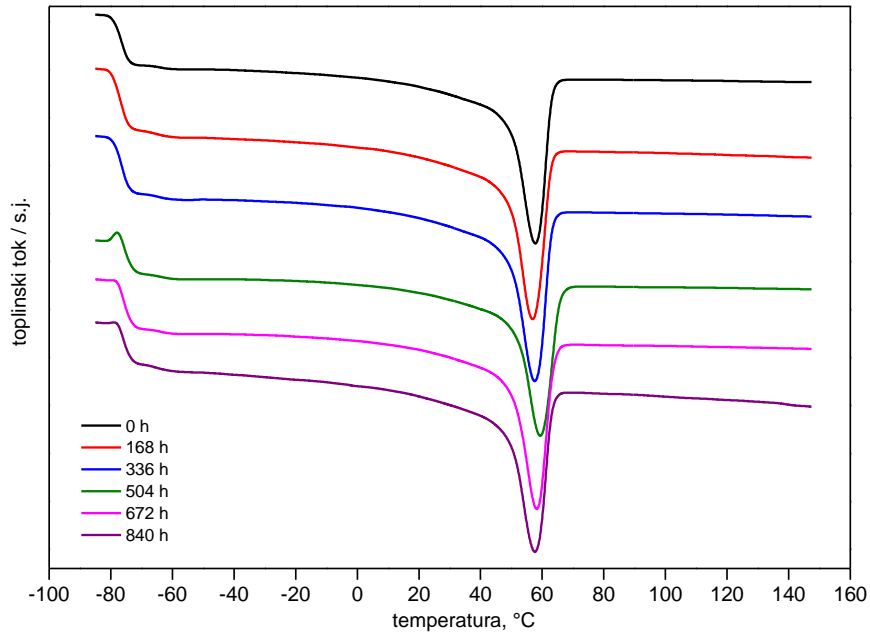
4.3.1. Rezultati DSC-a

U nastavku rada istražena su toplinska svojstva čistih komponenata PCL polimera i BW te PCL i BW mješavina različitoga sastava prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze, primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC).

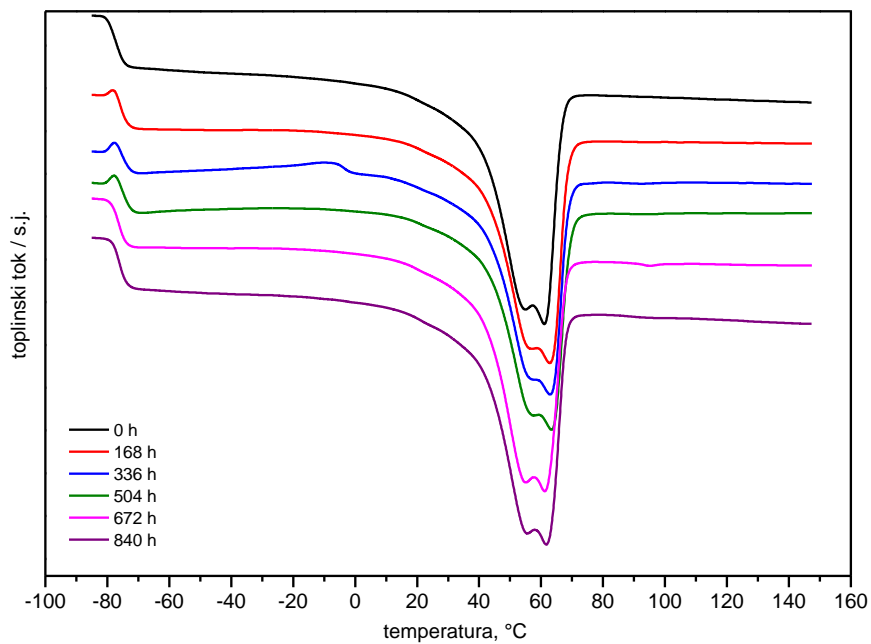
Na slikama 63-67. prikazani su usporedni DSC termogrami dobiveni u 2. ciklusu zagrijavanja čistih komponenata PCL i BW polimera te PCL/BW sastava 70/30 i 50/50 tijekom 5 tjedana razgradnje u HBSS otopini s lipazom *Candida cylindracea* i kroz 2 tjedna razgradnje u HBSS otopini s lipazom *Thermomyces lanuginosus*.

Endotermni prijelazi taljenja PCL, BW i PCL/BW mješavina dobiveni u 2. ciklusu zagrijavanja i egzotermni prijelazi kristalizacije dobiveni u ciklusu hlađenja prije i nakon različitih vremena razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze prikazani su na slikama 63-73.

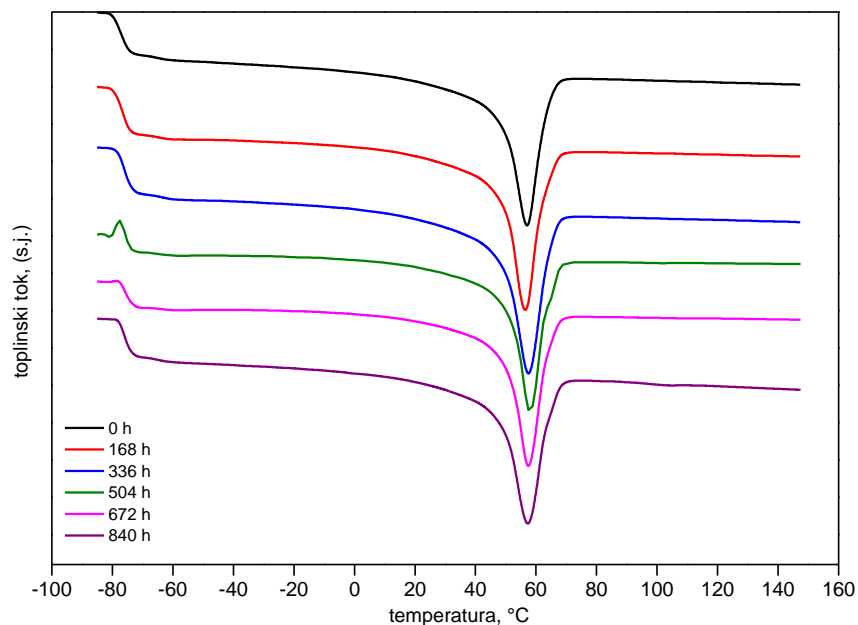
Vrijednosti temperature staklišta T_g , tališta T_m , kristlišta T_c te entalpije taljenja ΔH_m i entalpije kristalizacije ΔH_c očitani su iz termograma te dani u tablicama 12. i 13.



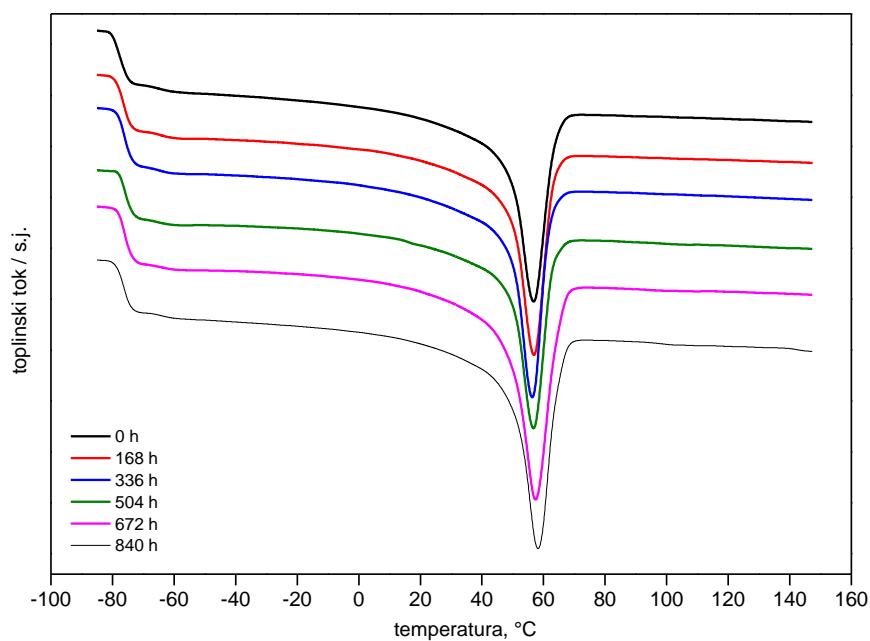
Slika 63. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PCL polimera prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



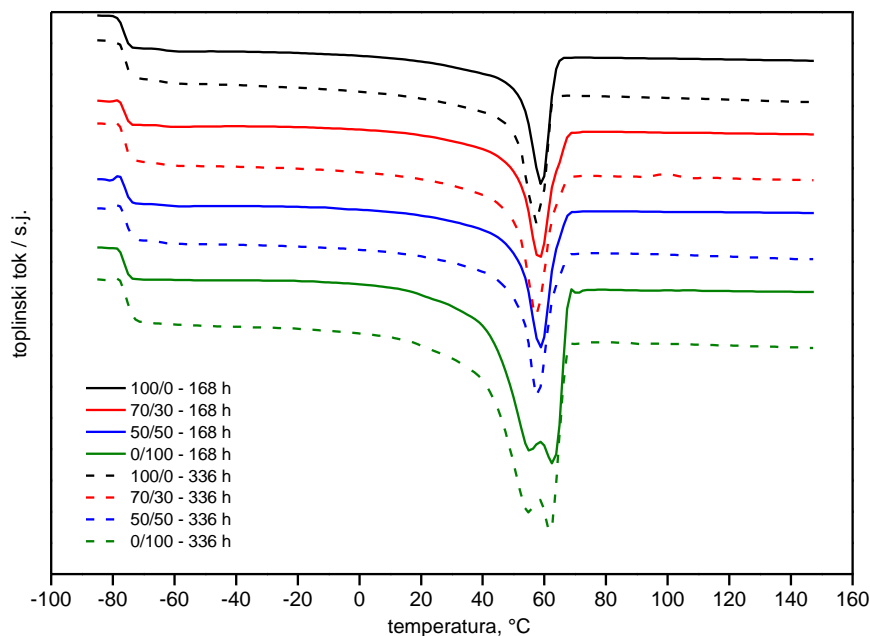
Slika 64. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja pčelinjeg voska (BW) prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 65. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PCL/BW mješavine sastava 70/30 prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 66. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PCL/BW mješavine sastava 50/50 prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 67. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Na termogramu semikristalnog PCL polimera dobivenom u 2. ciklusu zagrijavanja vidljiva su dva prijelaza, jedan koji odgovara staklastom prijelazu amorfne faze PCL-a na temperaturi $-63,57\text{ }^{\circ}\text{C}$, i drugi prijelaz u području temperatura od 0 do $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ koji odgovara taljenju kristalne faze PCL-a. Talište PCL polimera je pri $58,40\text{ }^{\circ}\text{C}$ što odgovara minimumu endoterma taljenja. Na krivulji hlađenja uočava se egzotermni prijelaz koji odgovara kristalizaciji PCL-a s kristalištem pri $29,75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na termogramu pčelinjeg voska (BW) dobivenom u 2. ciklusu zagrijavanja vidljiv je samo jedan prijelaz u širokom području temperatura ($0-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) koji odgovara taljenju kristalne faze BW-a. Minimum endoterma taljenja na $62,19\text{ }^{\circ}\text{C}$ odgovara talištu BW-a. Iz krivulje ciklusa hlađenja dobivena je vrijednost temperature kristališta koja iznosi $51,04\text{ }^{\circ}\text{C}$ koja odgovara maksimumu egzoterama.

U ciklusu zagrijavanja kod PCL/BW mješavina javlja se prijelaz karakterističan za amorfnu fazu, koji odgovara prijelazu iz staklastog u viskoelastično stanje, pri tome vrijednost staklišta PCL-a se gotovo i ne mijenja s povećanjem udjela pčelinjeg voska. Temperatura taljenja mješavina je niža u odnosu na temperature taljenja čistih komponenata. Kod PCL/BW mješavina vidljive su dvije temperature kristalizacije (dva pika na krivulji ciklusa hlađenja) koje odgovaraju temperaturama ishodbog PCL-a i BW-a, te se ne mijenjaju značajno u odnosu na vrijednosti za čiste komponente.

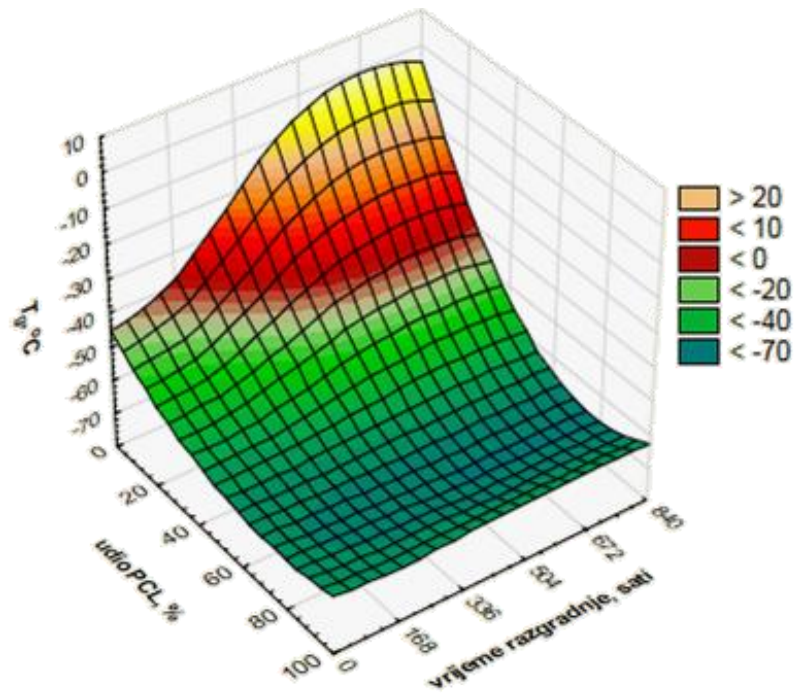
Tablica 12. Rezultati DSC mjerenja 2. ciklusa zagrijavanja PCL i BW te PCL/BW mješavina prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Enzim	Uzorak PCL/BW	Vrijeme razgradnje, (sati)	5. segment – 2. ciklus zagrijavanja			
			T _g , °C	T _m , °C	ΔH _m , J/g	X _c , %
<i>Lipaza Candida cylindracea</i>	100/0	0	-63,57	58,40	44,25	31,05
	70/30	0	-64,53	57,04	66,08	66,25
	50/50	0	-63,58	56,38	51,82	55,96
	0/100	0	-	62,19	162,99	
	100/0	168	-64,87	57,73	65,36	45,87
	100/0	336	-63,86	57,90	67,36	47,27
	100/0	504	-63,70	60,10	62,80	44,07
	100/0	672	-63,05	68,82	64,25	45,07
	100/0	840	-63,91	58,07	59,73	41,92
	70/30	168	-64,59	56,39	82,97	83,18
	70/30	336	-63,19	57,56	88,81	89,19
	70/30	504	-63,91	57,79	79,66	79,86
	70/30	672	-63,43	57,46	78,11	78,31
	70/30	840	-63,80	57,57	81,89	82,10
	50/50	168	-64,90	56,74	70,89	99,50
	50/50	336	-64,70	56,39	74,21	100,00
	50/50	504	-64,19	56,13	66,55	93,40
	50/50	672	-63,58	57,12	86,58	100,00
	50/50	840	-63,77	58,21	80,61	100,00
	0/100	168	-	63,75	166,35	
0/100	336	-	63,05	173,62		
0/100	504	-	64,27	161,65		
0/100	672	-	62,51	173,14		
0/100	840	-	63,04	171,89		
<i>Lipaza Thermomyces lanuginosus</i>	100/0	168	-63,65	59,41	67,28	47,21
	100/0	336	-64,47	57,56	67,71	47,51
	70/30	168	-64,03	58,09	78,26	78,46
	70/30	336	-63,49	57,57	84,62	84,83
	50/50	168	-63,50	58,60	80,86	100,00
	50/50	336	-63,44	57,72	83,93	100,00
	0/100	168	-	63,24	168,74	
	0/100	336	-	62,71	174,91	

Kako bi se utvrdilo da li i na koji način enzim lipaze djeluje na kristalizaciju čistih komponenata PCL-a i BW-a te mješavina PCL/BW različitog sastava praćena je promjena temperature taljenja i kristalizacije te entalpije taljenja i kristalizacije, prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kod svih uzoraka postoji promjena koja je najveća nakon 168 i 336 sati enzimske razgradnje.

Kod PCL/BW mješavina različitog sastava promjena kristalnosti je posljedica apsorbirane vode što se opaža u ranijoj fazi enzimske razgradnje. Apsorbirana voda ima plastificirajuće djelovanje na PCL polimer jer čini njegove lance znatno pokretljivijima. Porast stupnja kristalnosti semikristalnog poliestera PCL-a posljedica je orijentacije kraćih lanaca iz amorfne u kristalnu fazu. Produkti razgradnje su kraći lanci manje molekule mase i veće pokretljivosti koji su rezultat većeg stupnja kristalnosti. Stupanj kristalnosti čistog PCL polimera raste s 40,43 % na 42,66 % i 43,45 % nakon 168, odnosno 336 sati razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracea*. Nakon 336 sati razgradnje u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus* kristalnost PCL iznosi 63,46 %, što je povećanje od 1,6 puta u odnosu na PCL prije početka razgradnje. Na temelju rezultata uočljivo je da kristalnost ima isti trend kod PCL/BW mješavina različitog sastava tretiranih u lipazi *Candida cylindracea* i lipazi *Thermomyces lanuginosus*, gdje nakon 168 sati razgradnje dolazi do porasta kristalnosti u odnosu na kristalnost mješavina prije početka razgradnje. Nakon 504 sati hidrolitičke razgradnje dolazi do blagog pada vrijednosti entalpije kristalizacije, odnosno kristalnosti svih uzoraka s lipazom *Candida cylindracea*. Kod čistog BW-a i PCL/BW mješavine s udjelom PCL-a 50 % nakon 672 sati enzimske razgradnje dolazi do sniženja kristalnosti te stagnacije kristalnosti nakon 840 sati razgradnje. Razliku kristalnosti od 10 do 20 % veću kod PCL/BW mješavine sastava 50/50 u usporedbi s mješavinom s većim udjelom PCL polimera (70 %) možemo objasniti pretpostavkom da BW ne djeluje kao centar nukleacije, ne utječe na poboljšanje rasta kristala, već razara kristalnu strukturu PCL-a.

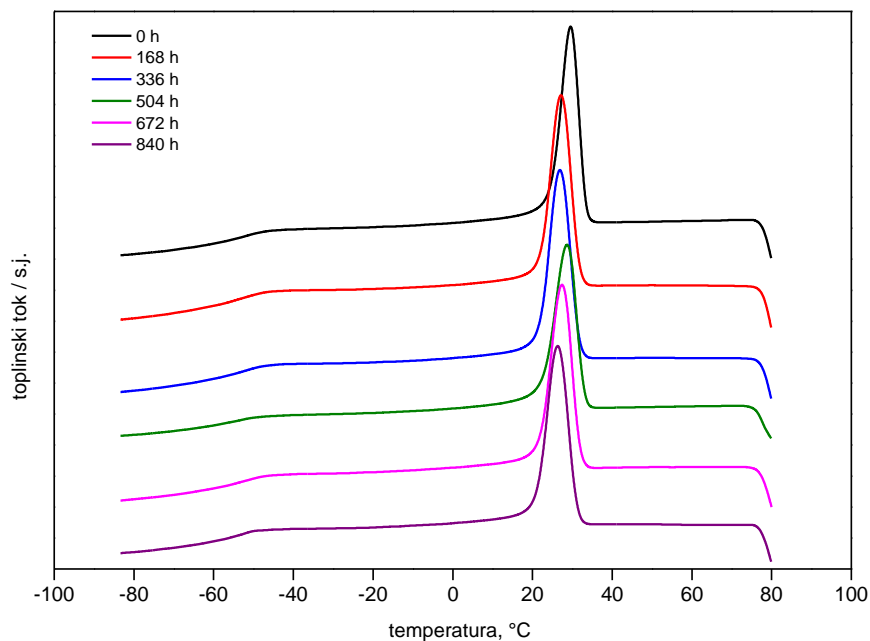
Temperatura staklastog prijelaza PCL polimera i PCL/BW mješavina u HBSS otopini tijekom razgradnje s lipazom *Candida cylindracea* i lipazom *Thermomyces lanuginosus* pomiču se prema nižim temperaturama nakon prvog tjedna razgradnje u odnosu na vrijednosti staklišta prije razgradnje, slika 68. Nakon 336 sati razgradnje staklišta PCL polimera i PCL/BW mješavina postupno se pomiče prema višim temperaturama što ukazuje na mješljivost PCL i BW faze mješavine. DSC uređaj nije bio u mogućnosti odrediti staklišta za čisti BW prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje.



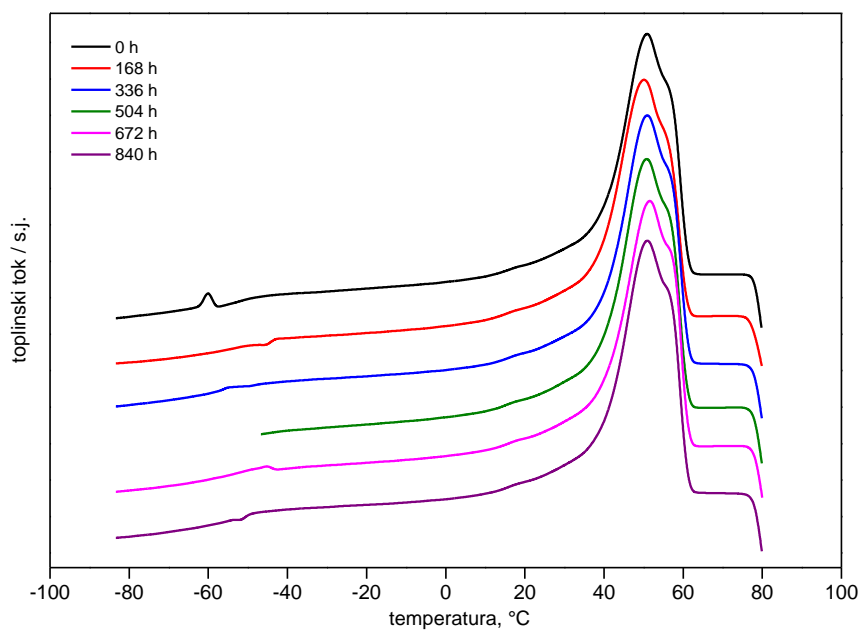
Slika 68. Ovisnost temperature staklastog prijelaza o vremena hidrolitičke razgradnje PCL/BW mješavina različitog sastava u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* nakon: a) 168 h, b) 336 h, c) 504 h, d) 672 h, d) 840 h

Ukoliko se promatra temperatura taljenja čistih komponenata PCL i BW te mješavina PCL/BW u ovisnosti o vremenu razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* i otopini s lipazom *Thermomyces lanuginosus* vidljive su male promjene u vrijednostima. Značajniji porast temperature taljenja uočava se nakon 504 sata kod čistog PCL-a, dok PCL/BW mješavine pokazuju porast nakon 336 sati razgradnje. Naveću promjenu tališta već nakon 168 sati razgradnje pokazuje pčelinji vosak što je rezultat formiranja kristalnih lamela veće debljine. Značajne promjene vrijednosti entalpije taljenja vidljive su kod svih mješavina tijekom 5, tj. 2 tjedna enzimske razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracea* i otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*. Vidljivo je da se temperatura i entalpija taljenja PCL/BW mješavina smanjuje dodatkom BW-a, za oko 2 °C i 20 J/g. Na osnovi dobivenih rezultata DSC mjerenja možemo zaključiti da su temperature taljenja čistih komponenata PCL-a i BW-a vrlo slične, 58,40 °C i 62,19 °C, dok se temperature kristalizacije značajno razlikuju, za gotovo 21 °C.

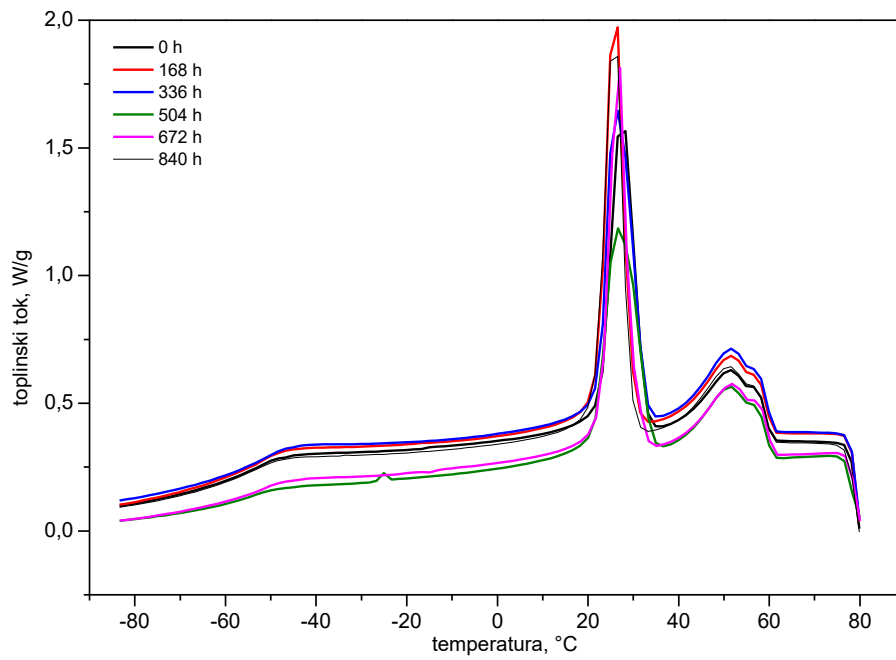
Na slikama 69-73. prikazani su usporedni DSC termogrami dobiveni u ciklusu hlađenja čistih komponenata PCL-a i BW-a te PCL/BW mješavina prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*. Vrijednosti temperature i entalpije kristalizacije te stupnja kristalnosti dane su u tablici 13.



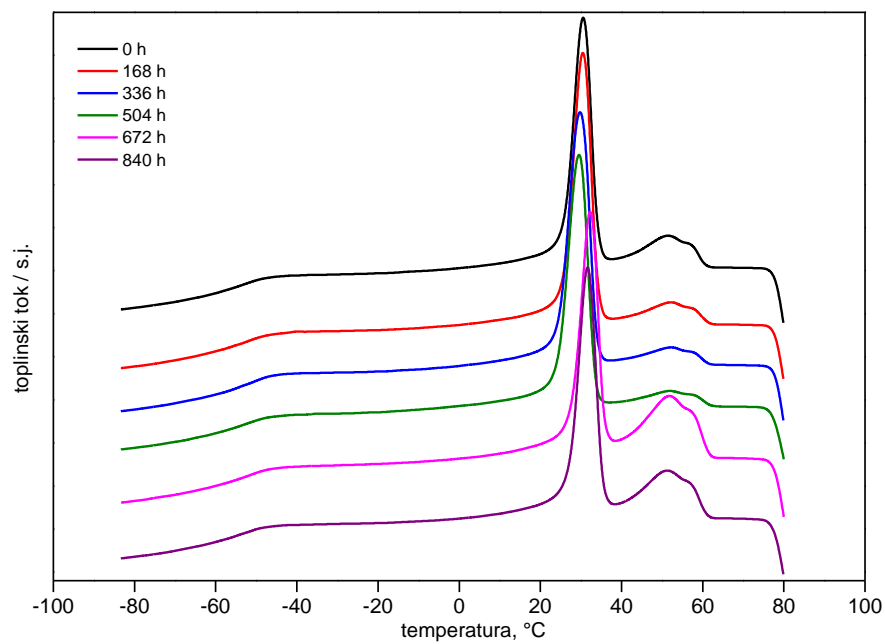
Slika 69. DSC krivulja ciklusa hlađenja PCL polimera prije i nakon različitih vremena enzimске razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



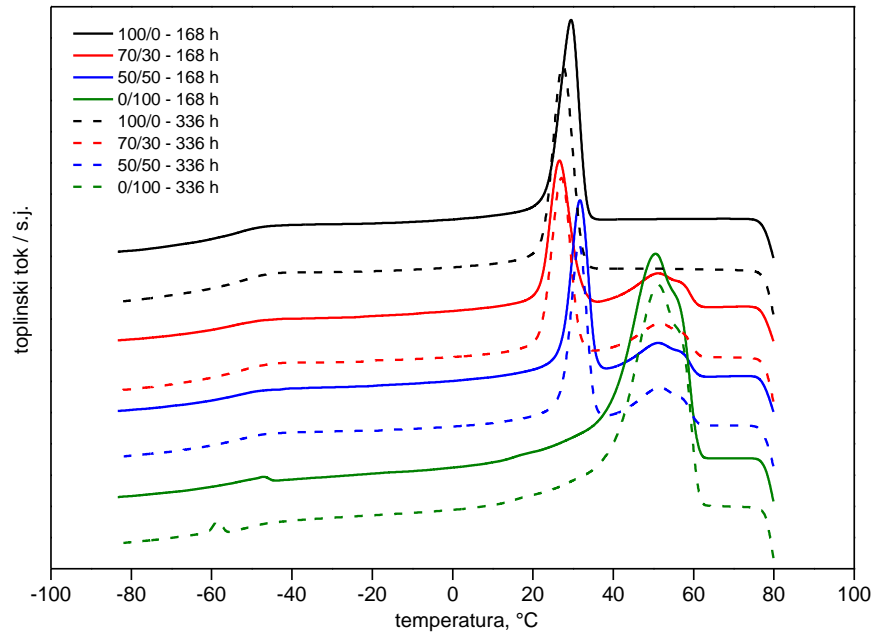
Slika 70. DSC krivulja ciklusa hlađenja pčelinjeg voska (BW) prije i nakon različitih vremena enzimске razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 71. DSC krivulja ciklusa hlađenja PCL/BW mješavine sastava 70/30 prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 72. DSC krivulja ciklusa hlađenja PCL/BW mješavine sastava 50/50 prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 73. DSC krivulja ciklusa hlađenja PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBBS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Tablica 13. Rezultati DSC mjerenja ciklusa hlađenja PCL/BW mješavina prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Enzim	Uzorak PCL/BW	Vrijeme razgradnje, (sati)	3. segment – ciklus hlađenja				
			T_c , °C		ΔH_c , J/g		X_c , %
	100/0	0	29,75	-	57,62	-	40,43
	70/30	0	27,56	51,88	43,38	17,84	
	50/50	0	30,73	52,22	47,15	10,42	
	0/100	0	51,04	-	168,97	-	
Lipaza <i>Candida cylindracea</i>	100/0	168	27,08	-	60,79	-	42,66
	100/0	336	26,92	-	62,05	-	43,45
	100/0	504	28,95	-	58,02	-	40,72
	100/0	672	27,62	-	60,91	-	42,74
	100/0	840	26,42	-	58,77	-	41,24
	70/30	168	25,91	51,89	49,26	21,77	
	70/30	336	26,08	51,90	49,94	23,14	
	70/30	504	26,63	51,62	42,60	19,54	
	70/30	672	26,60	51,99	44,91	20,96	
	70/30	840	25,75	51,40	48,65	22,85	
	50/50	168	30,59	52,41	51,99	8,40	

	50/50	336	30,41	52,73	56,38	64,92	
	50/50	504	29,61	52,11	54,05	6,26	
	50/50	672	32,62	52,18	52,18	24,64	
	50/50	840	31,90	51,72	47,04	18,48	
	0/100	168	49,94	-	158,21	-	
	0/100	336	51,06	-	177,41	-	
	0/100	504	50,94	-	176,51	-	
	0/100	672	51,72	-	170,56	-	
	0/100	840	51,05	-	176,04	-	
Lipaza <i>Thermomyces lanuginosus</i>	100/0	168	29,76	-	61,65	-	43,26
	100/0	336	27,41	-	63,30	-	63,46
	70/30	168	26,44	51,59	43,98	19,97	
	70/30	336	27,08	52,07	50,96	20,01	
	50/50	168	31,94	51,60	43,35	18,35	
	50/50	336	31,74	51,89	44,63	20,63	
	0/100	168	50,58	-	168,91	-	
	0/100	336	51,39	-	175,61	-	

Iz DSC krivulja dobivenih u ciklusu hlađenja za PCL/BW mješavine mogu se uočiti dva egzotermna prijelaza za razliku od čistih komponentata koje imaju samo jedan egoterm. Prvi egzoterm odgovara PCL polimeru, a egzoterm čiji je maksimum na oko 52 °C pripada BW-u. Rezultati dani u tablici 13. ukazuju na pomicanje kristališta PCL-a na više vrijednosti porastom udjela BW faze.

Na osnovi rezultata danih u tablici 13. vidljivo je da se porastom vremena enzimske razgradnje temperatura kristalizacije čistih komponenata smanjuje, dok vrijednost entalpije kristalizacije raste u odnosu na vrijednosti prije razgradnje. Kod PCL/BW mješavina različitog sastava kroz 5 odnosno 2 tjedna razgradnje u različitim otopinama lipaze, vrijednost entalpije taljenja se vrlo malo mijenjaju s obzirom na vrijednosti prije tretmana lipazom. Veće vrijednosti entalpije taljenja, tijekom 5 tjedana razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracea*, uočavaju se kod drugog egzoterma dobivenog u ciklusu hlađenja, koji odgovara BW komponenti mješavine. Kroz 2 tjedna razgradnje u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus* kod svih istraživanih mješavina temperature i entalpije kristalizacije se ne mijenjaju značajnije u usporedbi s vrijednostima prije početka razgradnje.

4.3.2. Rezultati TGA analize

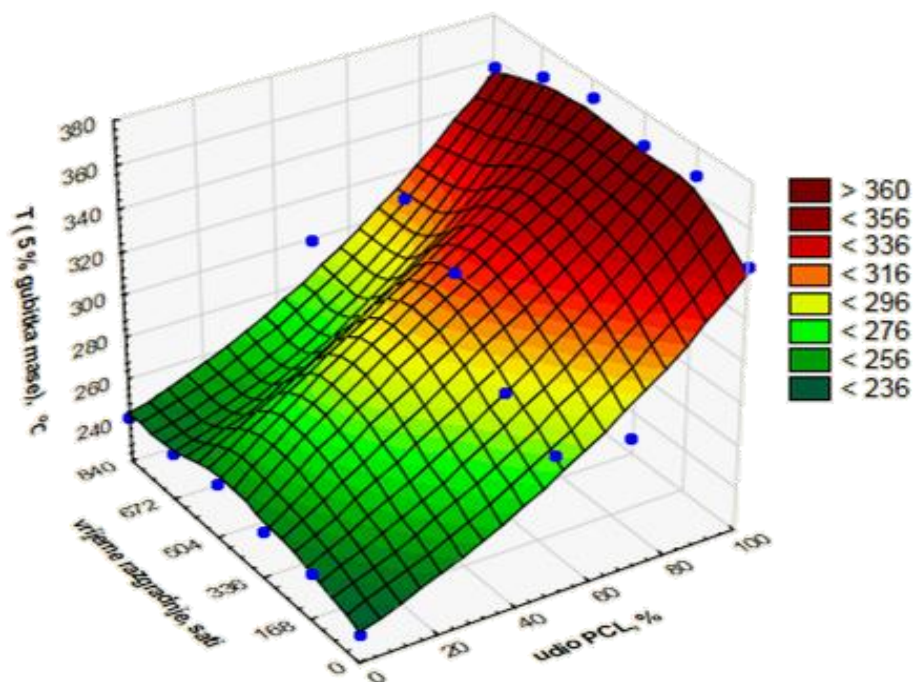
Termogravimetrijska analiza PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze, provedena je da bi se utvrdilo kako dodatak BW komponente PCL polimeru i enzimska razgradnja utječu na toplinsku stabilnost PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina.

Termogravimetrijska analiza provedena je u inertnoj struji dušika na uzorcima PCL, BW polimera i PCL/BW mješavina različitog sastava, prije te kroz 5 i 2 tjedna enzimske razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracea* i *Thermomyces lanuginosus*. TG i DTG krivulje svih istraživanih mješavina prikazane su na slikama 74-84., a vrijednosti očitane iz krivulja dane su u tablicama 14 i 15.

Iz rezultata je vidljivo da se PCL polimer razgrađuje u jednom stupnju relativno uskom području temperatura (oko 70 °C). U odnosu na PCL, razgradnja BW se odvija u dva stupnja u znatno širem temperaturnom području (oko 140 °C), pri čemu preostaje 0,93 % nerazgradivog ostatka.

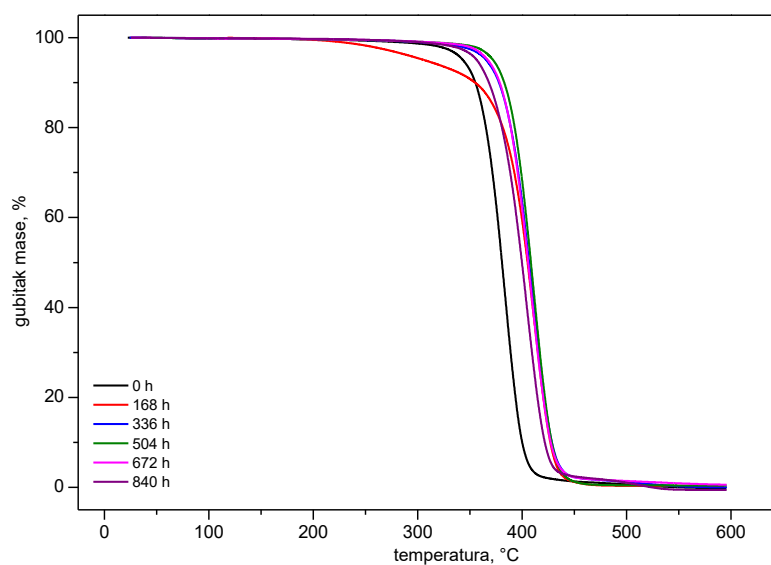
Toplinska razgradnja PCL/BW mješavina odvija se u jednom, tj. dva stupnja u relativno širokom temperaturnom području. Na mješljivost PCL polimera i BW-a ukazuje jedan, jasno izražen stupanj razgradnje kod mješavine PCL/BW 70/30. Kod PCL/BW mješavine sastava 50/50 prvi stupanj razgradnje odgovara razgradnji BW-a, dok drugi odgovara razgradnji PCL polimera. S obzirom da su PCL i BW mješljivi u određenom području sastava (do 50 % pčelinjeg voska) nije jasno izražen svaki stupanj razgradnje. Vrijednosti temperatura početka i kraja razgradnje PCL/BW mješavina nalaze se između vrijednosti za čisti PCL i čisti BW.

Dobiveni rezultati ukazuju na pomak početne i krajnje temperature razgradnje PCL i BW polimera prema višim vrijednostima nakon 168 sati razgradnje. Mješavine PCL i BW komponente slijede isti trend kao i ishodne komponente nakon tretmana enzimom. Možemo uočiti da se povećanjem udjela pčelinjeg voska (BW) u mješavini PCL/BW povećava temperatura potrebna za razgradnju 5 % mase uzorka. U mješavinama s većom udjelom PCL polimera (70 %) nema značajnije promjene temperature početka i kraja razgradnje u odnosu na čisti PCL. Kod PCL/BW mješavine sastava 50/50 temperatura početka razgradnje BW komponente mješavine pomiče se prema višim temperaturama. Na temelju dobivenih termograma i određenih vrijednosti može se zaključiti da dodatak PCL polimera povećava toplinsku stabilnost pčelinjeg voska (BW).

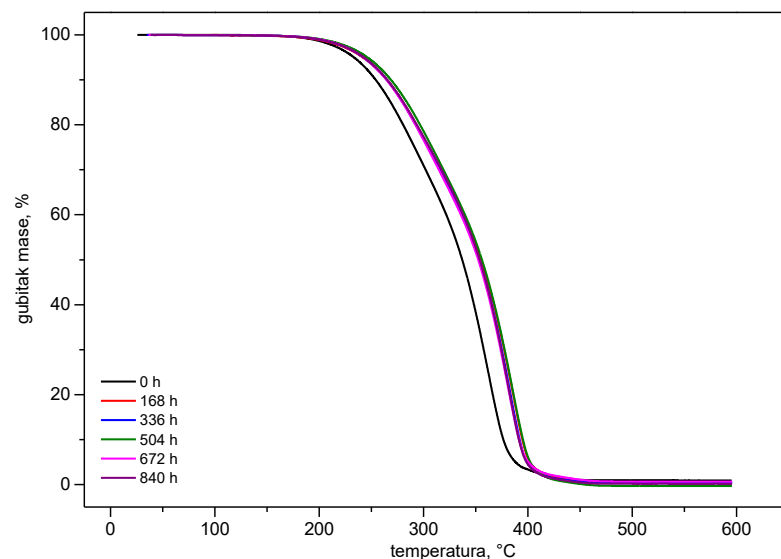


Slika 74. Ovisnost temperature kod 5 % gubitka mase o vremena hidrolitičke razgradnje PCL/BW mješavina različitog sastava u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea* nakon: a) 168 h, b) 336 h, c) 504 h, d) 672 h, e) 840 h

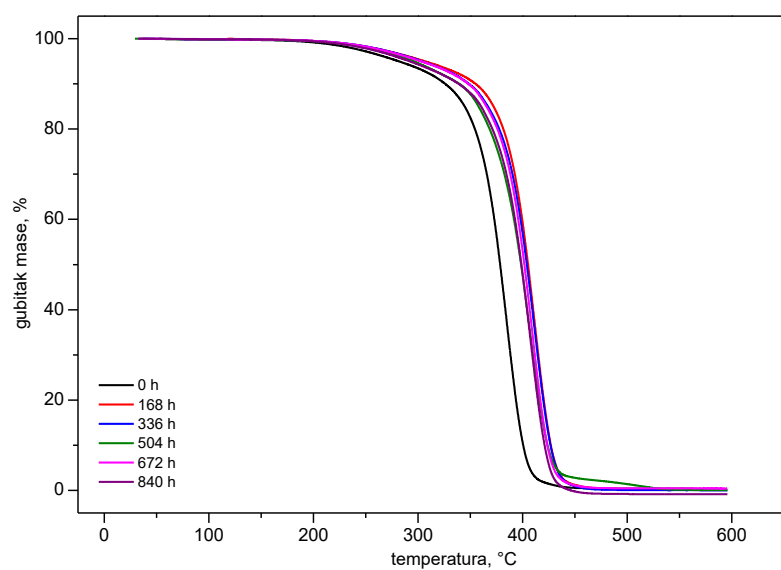
Nakon 168 sati razgradnje kod svih uzoraka vidljive su značajne promjene u vrijednostima temperature početka i kraja razgradnje kao i temperature potrebne za razgradnju 5 i 50 % mase uzorka, pri čemu postotak nerazgradivog ostatka raste. Nakon 336 sati razgradnje najveće promjene se uočavaju kod PCL/BW mješavine jer se ne uočavaju dva stupnja razgradnje kao prije početka razgradnje.



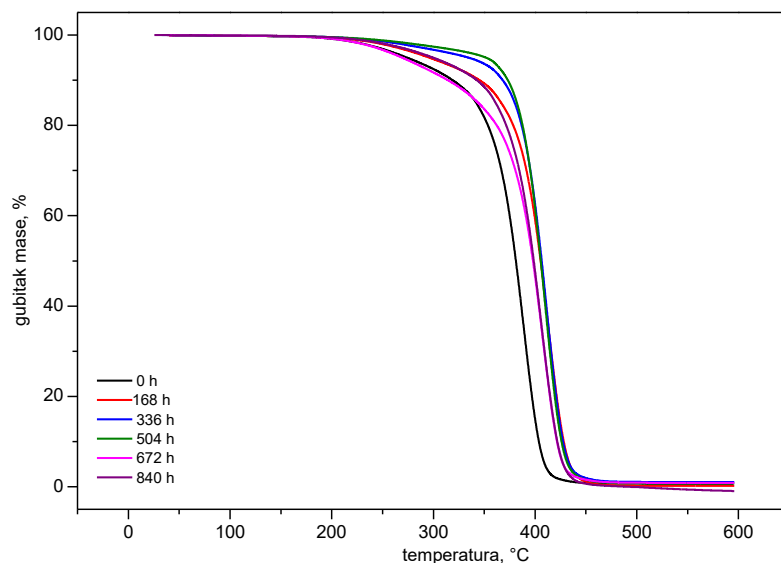
Slika 75. TG krivulja PCL polimera prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*



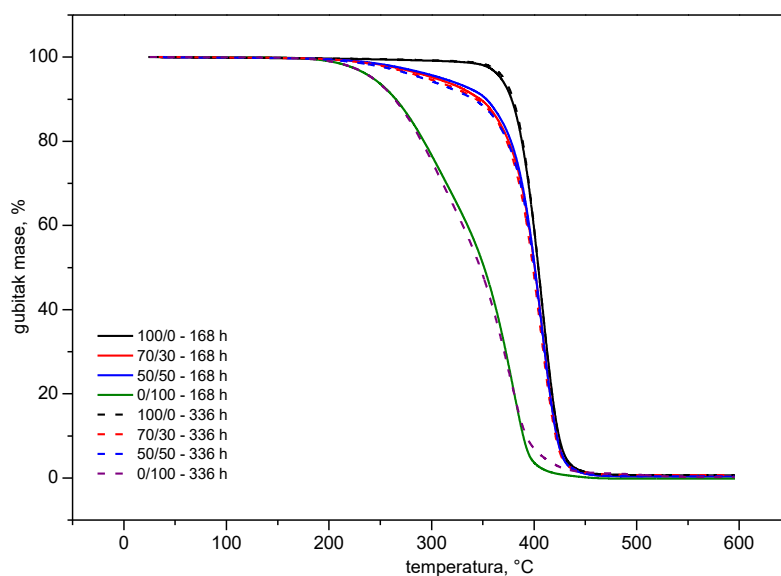
Slika 76. TG krivulja BW-a prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 77. TG krivulja PCL/BW mješavine 70/30 prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*

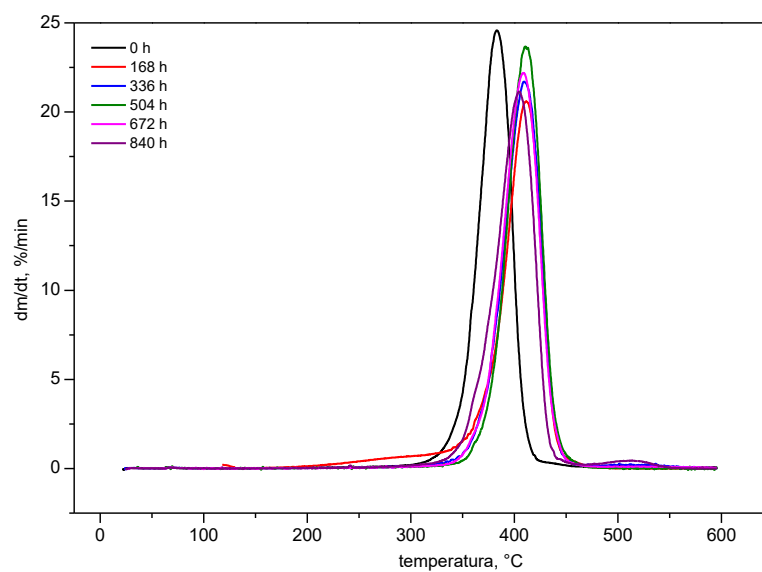


Slika 78. TG krivulja PCL/BW mješavine 50/50 prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*

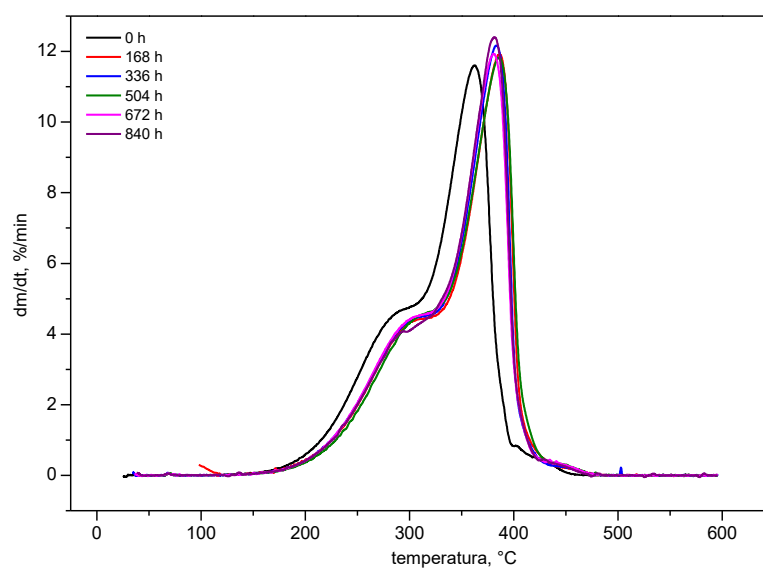


Slika 79. TG krivulja PCL/BW mješavina nakon određenog vremena u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*

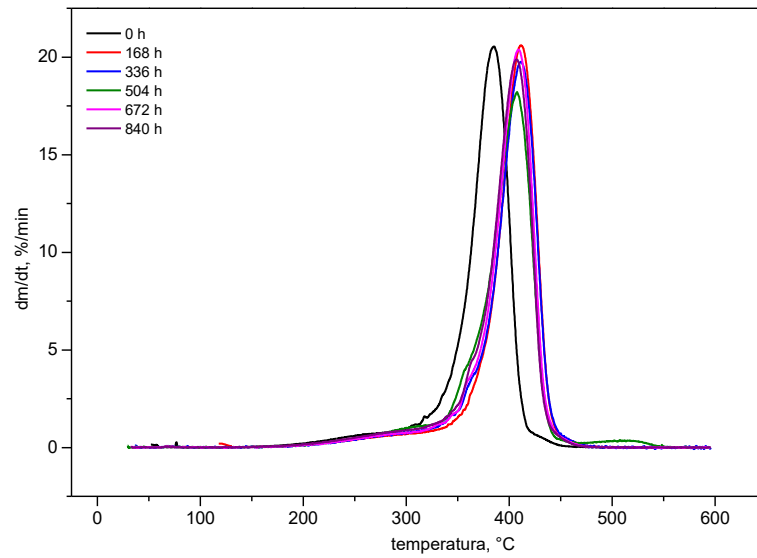
Na temelju dobivenih DTG krivulja očitane su vrijednosti maksimalne brzine razgradnje pojedinog uzorka prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje. Vrijednosti maksimalne brzine razgradnje uzorka PCL-a i BW-a starenih u HBSS otopini s lipazom *Candida cylindracea* i lipazom *Thermomyces lanuginosus*, pomiču se prema višim vrijednostima u odnosu na vrijednosti prije razgradnje. Tijekom tretmana PCL/BW mješavina različitog sastava lipazom, u vremenskom intervalu od 5 i 2 tjedna, vrijednosti maksimalne brzine razgradnje ne mijenjaju se značajnije.



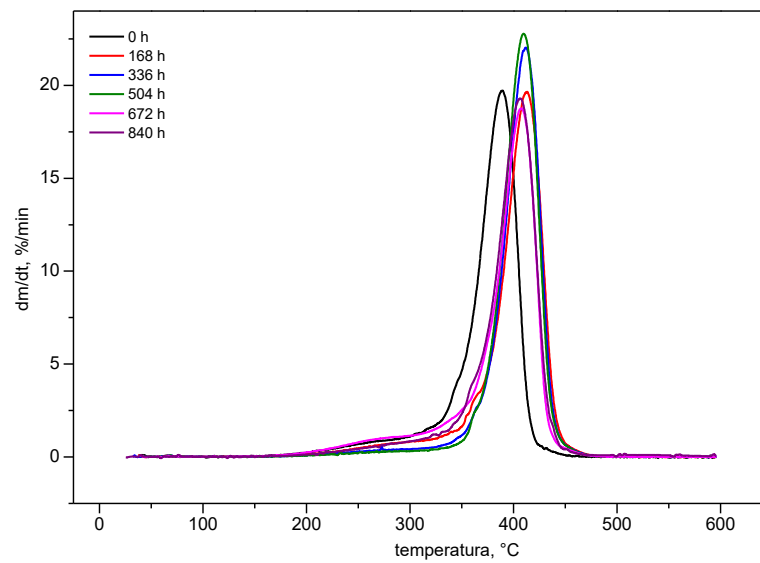
Slika 80. DTG krivulja PCL polimera prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*



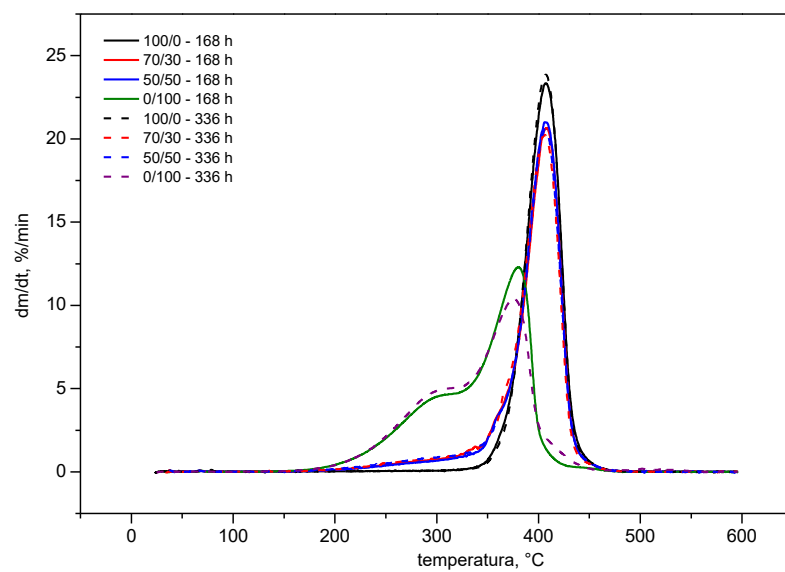
Slika 81. DTG krivulja BW-a prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 82. DTG krivulja PCL/BW mješavine 70/30 prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 83. DTG krivulja PCL/BW mješavine 50/50 prije i nakon određenog vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*



Slika 84. DTG krivulja PCL/BW mješavina nakon određenog vremena u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Tablica 14. Rezultati TGA mjerenja, vrijednosti temperatura početka razgradnje (T_{onset}), temperatura kod 5 % gubitka mase, temperatura kod 50 % gubitka mase, temperatura kraja razgradnje T_{end} , temperatura pri maksimalnoj brzini razgradnje T_{max} i ostatak za PCL/BW mješavine prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea*

Enzim	Uzorak PCL/BW	Vrijeme razgradnje, (sati)	T kod 5 % gubitka mase, °C	T kod 50 % gubitka mase, °C	T_{onset}^1 , °C	T_{onset}^2 , °C	T_{max} , °C	T_{end} , °C	Ostatak, %
Lipaza <i>Candida cylindracea</i>	100/0	0	343,51	380,76	352,95	-	383,18	403,32	0,0000
	70/30	0	281,60	378,56	350,02	-	383,17	404,32	0,3150
	50/50	0	285,89	375,00	236,72	351,03	330,48 383,95	402,13	0,0000
	0/100	0	233,38	337,08	225,94	330,59	283,41 362,89	381,56	0,9309
	100/0	168	368,21	410,37	367,03	-	434,08	438,63	0,7862
	100/0	336	365,82	406,57	370,56	-	409,80	432,26	0,0004
	100/0	504	372,37	408,47	364,61	-	410,67	435,64	0,4029
	100/0	672	367,20	405,80	370,60	-	409,10	433,43	0,5775
	100/0	840	356,74	399,86	365,49	-	404,81	424,04	0,0000
	70/30	168	306,61	405,21	372,32	-	411,22	441,33	0,3007
	70/30	336	304,01	404,07	369,33	-	411,24	434,25	0,0150
	70/30	504	295,88	398,56	350,85	-	407,75	427,53	0,0770
	70/30	672	303,84	401,71	364,66	-	409,03	428,46	0,4211
	70/30	840	292,12	398,91	364,05	-	406,80	426,29	0,0000
	50/50	168	296,15	405,41	270,93	357,99	354,34 413,43	434,79	0,1836
	50/50	336	334,37	406,52	352,35	-	411,82	432,03	1,0280
	50/50	504	351,72	405,58	365,31	-	409,78	430,81	0,7096
	50/50	672	269,34	397,87	357,60	-	407,55	426,13	0,8511
	50/50	840	299,62	398,71	362,90	-	406,57	427,43	0,0000
	0/100	168	241,98	355,09	229,81	337,87	296,82 386,63	401,90	0,4901
0/100	336	242,56	353,44	241,53	352,62	295,90 383,72	398,02	0,3138	
0/100	504	246,28	356,05	239,58	359,05	300,29 386,11	401,84	0,0000	
0/100	672	242,34	352,39	233,19	353,22	296,90 381,21	396,77	0,6675	
0/100	840	241,81	353,82	232,71	352,82	288,76 382,57	395,63	0,1502	

Tablica 15. Rezultati TGA mjerenja, vrijednosti temperatura početka razgradnje (T_{onset}), temperatura kod 5 % gubitka mase, temperatura kod 50 % gubitka mase, temperatura kraja razgradnje T_{end} , temperatura pri maksimalnoj brzini razgradnje T_{max} i ostatak za PCL/BW mješavine nakon različitih vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Enzim	Uzorak PCL/BW	Vrijeme razgradnje, (sati)	T kod 5 % gubitka mase, °C	T kod 50 % gubitka mase, °C	T_{onset}^1 , °C	T_{onset}^2 , °C	T_{max} , °C	T_{end} , °C	Ostatak, %
Lipaza <i>Thermomyces lanuginosus</i>	100/0	168	367,50	404,10	368,01	-	407,62	428,40	0,6096
	100/0	336	370,36	404,10	371,40	-	407,28	427,16	0,6655
	70/30	168	303,40	400,61	360,89	-	409,09	428,20	0,3783
	70/30	336	295,41	398,78	364,92	--	407,79	424,29	0,7054
	50/50	168	309,99	400,70	301,33	377,87	357,72 408,68	426,82	0,3193
	50/50	336	291,32	399,94	291,32	-	406,62	428,79	0,4220
	0/100	168	242,73	351,28	239,79	353,77	290,66 380,84	395,57	0,0000
	0/100	336	242,60	347,47	242,60	351,74	300,48 376,29	394,79	0,1690

PCL polimer doprinosi povećanju toplinske stabilnosti pčelinjeg voska (BW). Povećanje toplinske stabilnosti mješavina PCL/BW različitog sastava prije, ali i nakon enzimske razgradnje posljedica je veće toplinske stabilnosti PCL-a u odnosu na BW. Dio uzorka PCL/BW mješavine nakon razgradnje u otopini enzima lipaze se razgradio pa se toplinska svojstva približavaju vrijednostima toplinski stabilnijeg PCL polimera.

Mješavine PCL/BW izložene djelovanju enzima lipaze *Candida cylindracea* pokazuju manju toplinsku stabilnost nakon 336 sati razgradnje, u odnosu na PCL/BW mješavine izložene starenju uslijed djelovanja lipaze *Thermomyces lanuginosus* u istom vremenskom periodu.

4.4. Mehanička svojstva PCL i PCL/BW mješavina

4.4.1. Rezultati mehaničkih ispitivanja

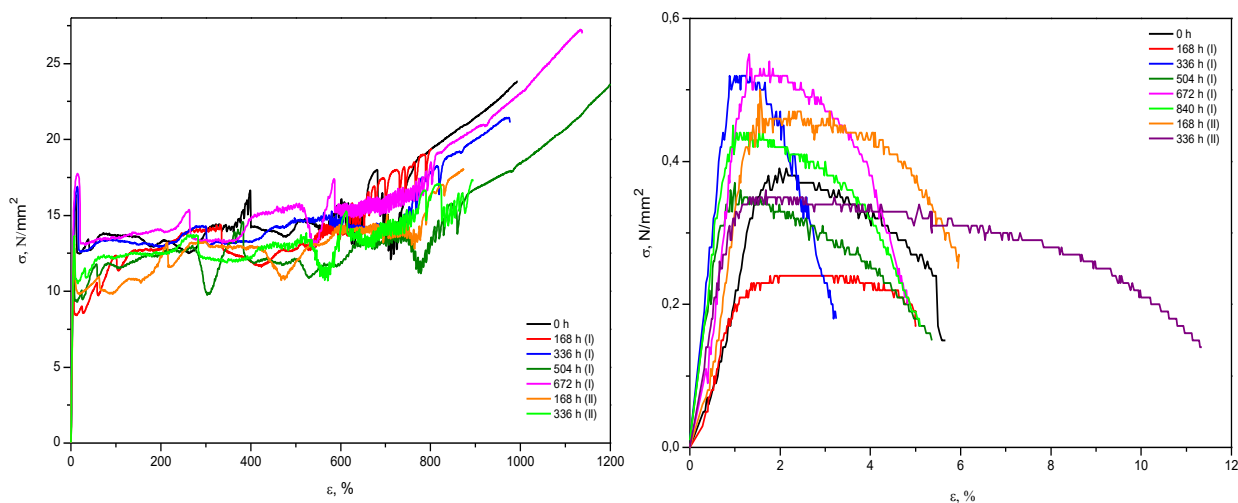
U nastavku rada provedena su ispitivanja mehaničkih svojstava kako bi se dobio detaljniji uvid utjecaja enzimske razgradnje na svojstva uzorka mješavina PCL i BW. Također, mehaničkim ispitivanjima istražen je utjecaj pčelinjeg voska (BW) na mehanička svojstva PCL polimera. Mehaničkim ispitivanjem dobivaju se vrijednosti rastezne čvrstoće (σ), prekidnog istezanja (ϵ) i rasteznog modula (E) koji su od izuzetne važnosti u primjeni. Mehanička svojstva mješavina općenito su uvjetovana stupnjem kristalnosti polimera, njegovom morfologijom kao i svojstvima međupovršine.

Na slikama 85. i 86. prikazane su krivulje napezanje-istezanje PCL, BW i PCL/BW mješavina prije i nakon 5 tjedana razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze *Candida cylindracea*. Krivulje naprezanje-istezanje PCL i BW izloženih starenju u otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus* prikazane su na slikama 85. i 86. Rezultati ispitivanja mehaničkih svojstava PCL/BW mješavina različitog sastava nakon odgovarajućeg vremena enzimske razgradnje dani su u tablici 16.

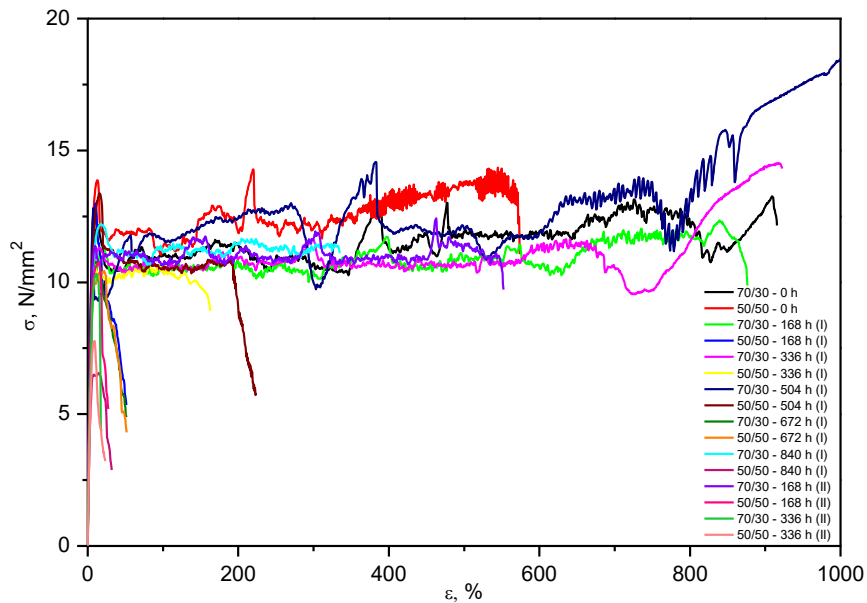
Krivulja naprezanja prikazuje međusobnu ovisnost vlačnog naprezanja i relativnog produljenja tj. produljenja s obzirom na početnu duljinu. Krivulja naprezanje-istezanje čistog PCL polimera prije djelovanja enzima, odražava ponašanje viskoelastičnog materijala jasno izražene granice razvlačenja. Kod PCL polimera vidljivo je područje hladnog tečenja. Karakteristika ovog područja je da nakon točke popuštanja naprezanje naglo pada, a daljnjim istezanjem uzorka naprezanje se vrlo malo mijenja dok deformacija raste. Nakon jednoličnog istezanja ispitne epruvete za svega nekoliko postotaka, na mjestu početka popuštanja dolazi do suženja presijeka epruvete, odnosno formiranja vrata (*eng. neck*). Daljnjim istezanjem epruvete suženje se pomiče duž epruvete, sve dok cijela epruveta ne prijeđe u suženje. Vrijednost istezanja doseže nekoliko stotina % od svoje početne duljine. Nakon hladnog tečenja, daljnjim istezanjem uzorka PCL-a naprezanje raste do loma uzorka (ispitne epruvete), slika 85. Na osnovi eksperimentalno dobivene krivulje naprezanje-istezanje PCL polimera uočava se visoka vrijednost istezanja polimera, nisko naprezanje pri popuštanju te velika žilavost na što ukazuje velika vrijednost rada. S obzirom na vrijednosti značajki danih u tablici 15, PCL polimer se može okarakterizirati kao slab (mekan) i žilav polimerni materijal.

Krivulje naprezanje-istezanje za čisti pčelinji vosak (BW) prikazane su na slici 85, dok su rezultati mehaničkog ispitivanja dani u tablicama 16. i 17.

Na slici 86. prikazane su krivulje naprezanje-istezanje PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje. Dodatkom BW u PCL mehanička svojstva pripremljene mješavine se znatno razlikuju od mehaničkih svojstava čistog PCL-a. U tablicama 16. i 17. dane su vrijednosti značajki (rastezne čvrstoće, rasteznog modula, prekidne čvrstoće, prekidnog istezanja i rada) očitanih iz krivulje.



Slika 85. Krivulje naprezanje-istezanje PCL i BW prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* (I) i lipaze *Thermomyces lanuginosus* (II)



Slika 86. Krivulje naprezanje-istezanje PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon određenog vremena enzimske razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* (I) i lipaze *Thermomyces lanuginosus* (II)

Na temelju krivulje naprezanje-istezanje čistog pčelinjeg voska (BW) možemo uočiti vrlo niske vrijednosti prekidne čvrstoće, rasteznog modula i rada. Vrlo mala vrijednost rada govori o vrlo maloj žilavosti materijala, koja je više od 60 puta manja od rada potrebnog za kidanja PCL polimera. možemo zaključiti da je BW vrlo mekan, slab materijal niskog rasteznog modula, slika 86.

Dodatkom BW-a PCL polimeru mehanička svojstva mješavine znatno se razlikuju od mehaničkih svojstava čistog PCL-a i BW-a. Krivulja naprezanje-istezanje PCL/BW mješavina ukazuje na područje hladnog tečenja nakon točke popuštanja, pri čemu je istežanje epruvete nekoliko % od početne duljine. Rezultati mehaničkih ispitivanja ukazuju na narušena svojstva PCL-a dodatkom BW-a. Povećanjem udjela BW u mješavini PCL/BW vidljivo je smanjenje prekidne čvrstoće, prekidnog istežnja i rada, tablica 15. Također, krutost mješavine, na što ukazuje rastezni modul, se smanjuje porastom udjela BW faze.

Tablica 15. Vrijednosti rastezne čvrstoće (σ_v), rasteznog modula (E), prekidne čvrstoće (ϵ_p), prekidnog istežanja (σ_p) i rada (W) PCL/BW mješavina različitog sastava prije izlaganja enzimskoj razgradnji

Uzorak	σ_v , N/mm ²	ϵ_v , %	σ_p , N/mm ²	ϵ_p , %	E , N/mm ²	W , Nm
100/0	16,13 ± 1,3	12,49 ± 3,4	24,83 ± 1,7	966,71 ± 64,2	332,5 ± 25,9	69,6 ± 5,9
70/30	12,10 ± 0,07	19,91 ± 0,9	15,13 ± 1,8	941,71 ± 32,2	181,0 ± 82,1	49,8 ± 2,3
50/50	11,59 ± 0,3	11,17 ± 0,7	13,42 ± 1,5	443,29 ± 168,9	254,3 ± 20,5	23,7 ± 11,1
0/100	0,24 ± 0,2	1,55 ± 1,0	0,31 ± 0,02	2,69 ± 1,15	12,8 ± 7,2	0,007 ± 0,004

Tablica 16. Vrijednosti vlačne (rastezne) čvrstoće (σ_v), rasteznog modula (E), prekidne čvrstoće (ϵ_p), prekidnog istezanja (σ_p) i rada (W) PCL/BW mješavina različitog sastava nakon određenog vremena enzimske razgradnje u lipazi *Candida cylindracea* i lipaze *Thermomyces lanuginosus*

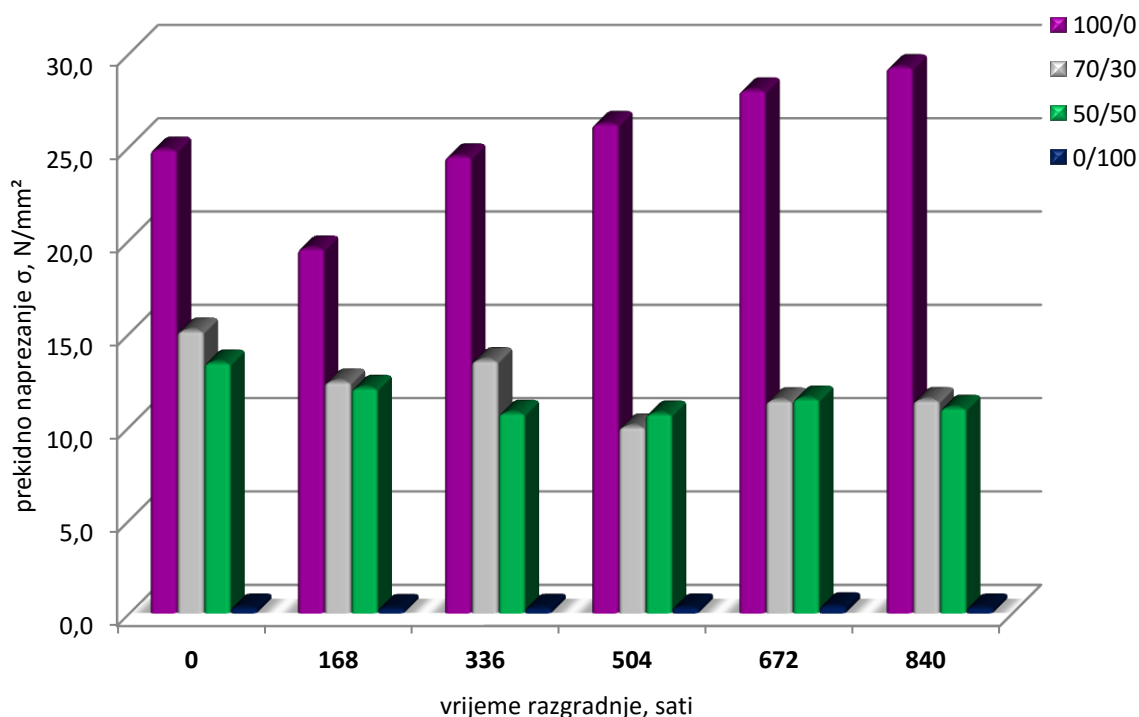
Enzim	Uzorak PCL/BW	Vrijeme razgradnje, sati	σ_v , N/mm ²	ϵ_v , %	σ_p , N/mm ²	ϵ_p , %	E, N/mm ²	W, Nm
Lipaza <i>Candida cylindracea</i>	100/0	168	14,42 ± 2,2	10,61 ± 3,4	19,53 ± 0,6	832,71 ± 21,5	358,8 ± 37,2	56,7 ± 9,6
	100/0	336	16,97 ± 0,1	14,98 ± 0,14	24,46 ± 4,5	1029,57 ± 67,0	284,1 ± 8,8	73,3 ± 13,8
	100/0	504	14,08 ± 0,7	10,69 ± 2,4	26,20 ± 2,3	1221,66 ± 52,1	222,7 ± 27,5	96,7 ± 9,6
	100/0	672	17,38 ± 0,4	13,82 ± 0,9	28,12 ± 2,1	1138,92 ± 51,8	283,9 ± 61,0	82,5 ± 5,6
	100/0	840	16,47 ± 1,7	13,38 ± 2,0	29,24 ± 1,0	1185,57 ± 35,5	294,7 ± 57,6	89,7 ± 5,8
	70/30	168	10,91 ± 0,5	10,0 ± 1,4	12,4 ± 1,0	616,85 ± 295,8	240,8 ± 26,9	23,8 ± 15,4
	70/30	336	10,75 ± 0,6	11,86 ± 2,2	13,54 ± 1,0	828,52 ± 137,7	216,9 ± 29,3	45,0 ± 4,9
	70/30	504	9,37 ± 0,2	10,55 ± 0,7	9,99 ± 0,1	321,70 ± 97,5	169,9 ± 84,9	18,5 ± 5,8
	70/30	672	11,11 ± 0,5	15,23 ± 0,9	11,39 ± 0,3	277,81 ± 71,3	236,3 ± 17,7	17,4 ± 0,2
	70/30	840	11,43 ± 0,4	13,51 ± 2,4	11,41 ± 0,5	18,76 ± 3,6	248,1 ± 29,9	10,9 ± 4,1
	50/50	168	11,96 ± 0,7	11,66 ± 1,9	12,06 ± 0,5	21,00 ± 6,4	164,6 ± 78,3	2,2 ± 0,2
	50/50	336	10,90 ± 0,1	10,61 ± 1,2	10,72 ± 0,2	37,38 ± 29,0	205,5 ± 24,9	6,8 ± 2,8
	50/50	504	10,81 ± 1,7	14,26 ± 0,8	10,68 ± 1,8	15,72 ± 0,9	274,6 ± 16,2	5,1 ± 4,5
	50/50	672	11,56 ± 1,3	12,53 ± 2,5	11,49 ± 1,0	16,79 ± 2,4	250,9 ± 17,6	3,5 ± 2,7
	50/50	840	10,92 ± 0,4	13,03 ± 0,8	10,99 ± 0,5	6,29 ± 1,6	300,7 ± 39,6	1,4 ± 0,6
	0/100	168	0,31 ± 0,03	2,24 ± 0,4	0,27 ± 0,1	2,32 ± 1,2	14,5 ± 3,0	0,01 ± 0,0
	0/100	336	0,33 ± 0,2	0,89 ± 0,6	0,29 ± 0,2	1,95 ± 0,9	24,9 ± 22,6	0,01 ± 0,0
	0/100	504	0,35 ± 0,03	1,49 ± 0,3	0,32 ± 0,01	2,86 ± 0,4	30,3 ± 17,0	0,01 ± 0,0
	0/100	672	0,45 ± 0,07	1,73 ± 0,5	0,39 ± 0,07	3,01 ± 0,5	29,1 ± 16,6	0,01 ± 0,0
	0/100	840	0,36 ± 0,06	1,46 ± 0,4	0,31 ± 0,04	2,68 ± 0,4	35,9 ± 16,7	0,01 ± 0,0
Lipaza <i>Thermomyces lanuginosus</i>	100/0	168	13,13 ± 0,0	7,80 ± 0,0	18,13 ± 0,0	874,88 ± 0,0	93,9 ± 0,0	52,3 ± 0,0
	100/0	336	13,69 ± 0,0	7,35 ± 0,0	17,38	893,17 ± 0,0	334,5 ± 0,0	52,62 ± 0,0
	70/30	168	11,43 ± 0,0	10,27 ± 0,0	12,45 ± 0,0	462,83 ± 0,0	319,1 ± 0,0	26,7 ± 0,0
	70/30	336	10,33 ± 0,0	11,83 ± 0,0	10,12 ± 0,0	13,53 ± 0,0	242,2 ± 0,0	0,68 ± 0,0
	50/50	168	10,80 ± 0,0	15,12 ± 0,0	10,56 ± 0,0	16,64 ± 0,0	298,6 ± 0,0	1,05 ± 0,0
	50/50	336	7,80 ± 0,0	8,99 ± 0,0	7,17 ± 0,0	10,63 ± 0,0	168,2 ± 0,0	0,56 ± 0,0
	0/100	168	0,50 ± 0,0	1,57 ± 0,0	0,47 ± 0,0	3,11 ± 0,0	20,7 ± 0,0	0,01 ± 0,0
	0/100	336	0,36 ± 0,0	1,73 ± 0,0	0,35 ± 0,0	3,05 ± 0,0	34,6 ± 0,0	0,02 ± 0,0

Iz rezultata mehaničkih ispitivanja vidljivo je da nakon 168 sati enzimske razgradnje dolazi do blagog porasta prekidne čvrstoće i istezanja kod čistih komponenata PCL-a i BW-a. Vrijednosti rasteznog modula se značajno smanjuju tijekom enzimske razgradnje kod PCL polimera i mješavina PCL/BW, izuzev BW-a kod kojega krutost kontinuirano raste u vremenu. Kod PCL/BW mješavina različitog sastava nakon 168 sati razgradnje dolazi do pada prekidne

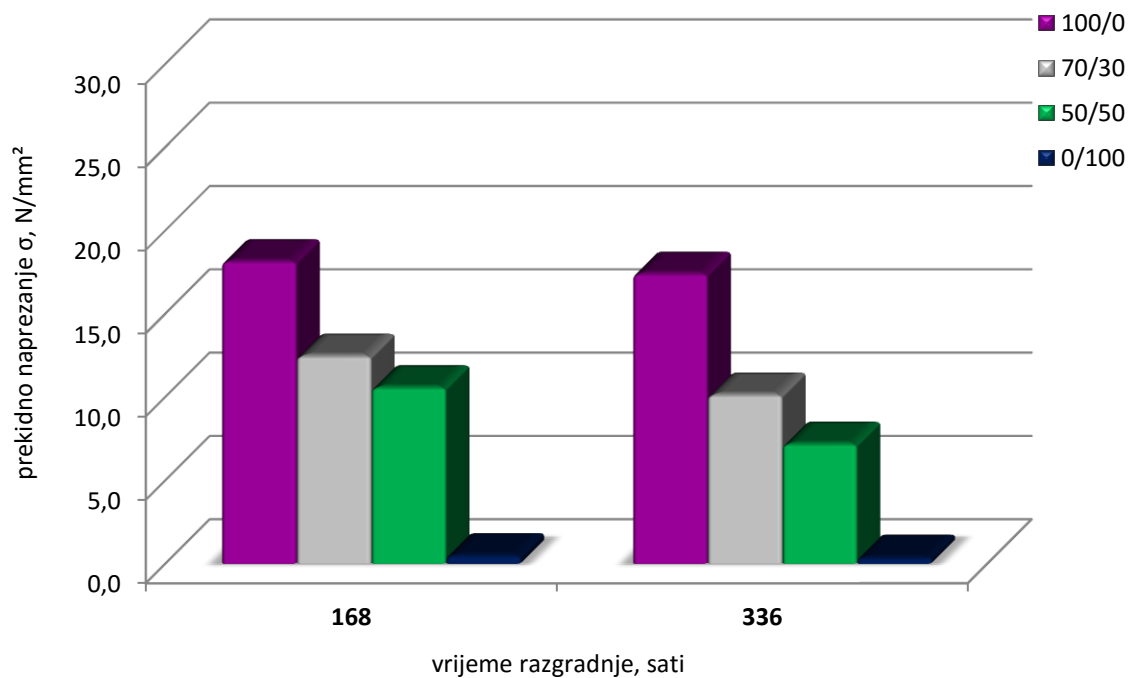
čvrstoće i istezanja. Krutost i žilavost PCL/BW mješavina tijekom vremena razgradnje u HBSS otopini lipaze se smanjuju.

Na slikama 87-89. prikazane su promjene čvrstoće i istezanja PCL/BW mješavina različitog sastava tijekom određenog vremena enzimske razgradnje. Kod uzoraka PCL/BW mješavina tijekom 6 tjedana razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracei* tijekom 2 tjedna u otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus* mehanička svojstva se ne razlikuju bitnije od svojstava prije izlaganja djelovanju enzima. Vrijednosti prekidne čvrstoće i prekidnog istezanja pokazuju diskontinuirani pad, dok se rastezni modul veći od uzorka prije početka razgradnje. Sniženje vrijednosti mehaničkih svojstava PCL/BW mješavina tijekom duljeg vremena enzimske razgradnje može se povezati s nastalom poroznom strukturom. Uslijed takve strukture, voda i enzim lakše prodiru u unutrašnjost uzorka što doprinosi bržoj razgradnji. Porast vrijednosti rasteznog modula upućuje na porast kristalnosti uzorka s obzirom da je razgrađena amorfnu fazu mješavine zbog djelovanja enzima. Jedan od mogućih razloga smanjenja mehaničkih svojstava je način pripreme mješavine. Nejednolika raspodjela BW faze u PCL matrici predstavlja slaba mjesta u strukturi mješavine te na tim mjestima započinje popuštanje tijekom naprezanja.

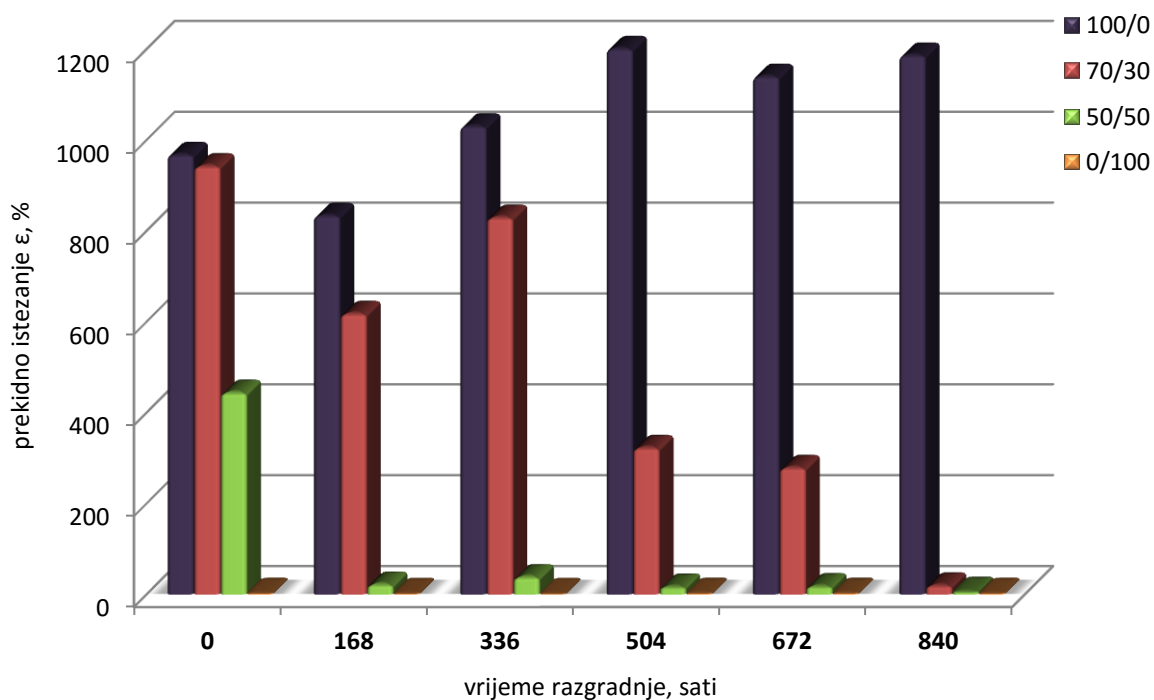
Na slikama 87-90. prikazana je ovisnost prekidne čvrstoće i prekidnog istezanja o PCL/BW mješavina različitog sastava o vremenu enzimske razgradnje u HBSS otopini enzima lipaze.



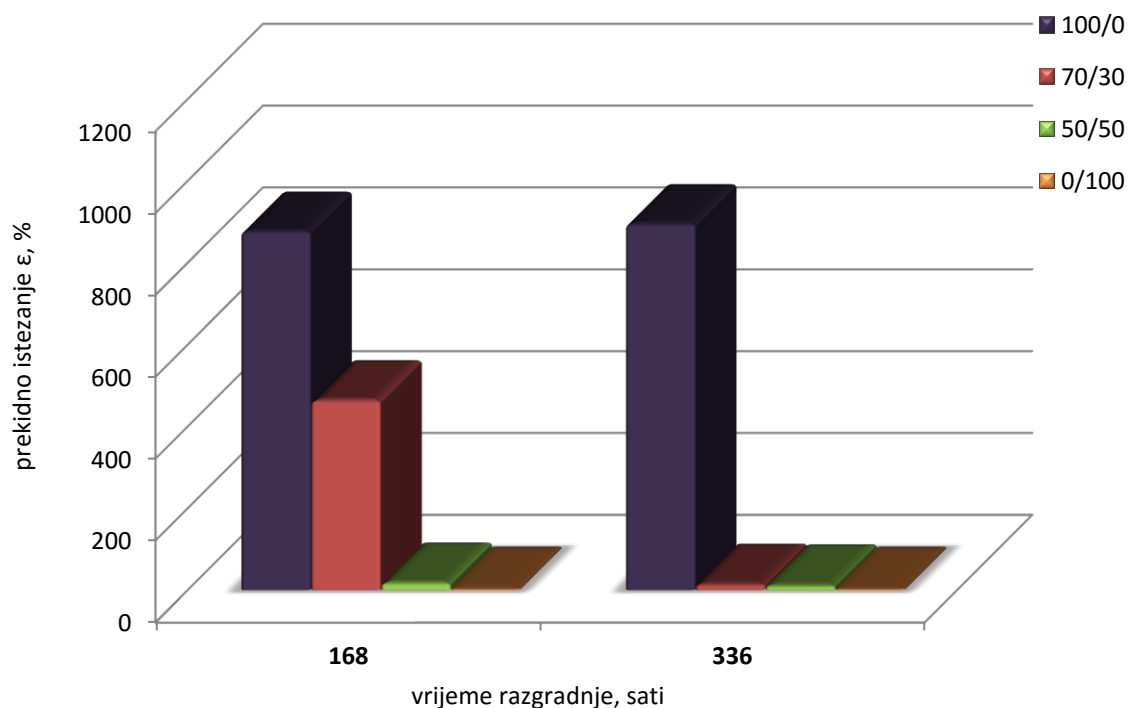
Slika 87. Vrijednosti prekidnog naprezanja PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon 5 tjedna razgradnje u lipazi *Candida cylindracea*



Slika 88. Vrijednosti prekidnog naprežanja PCL/BW mješavina različitog sastava nakon 2 tjedna razgradnje u lipazi *Thermomyces lanuginosus*

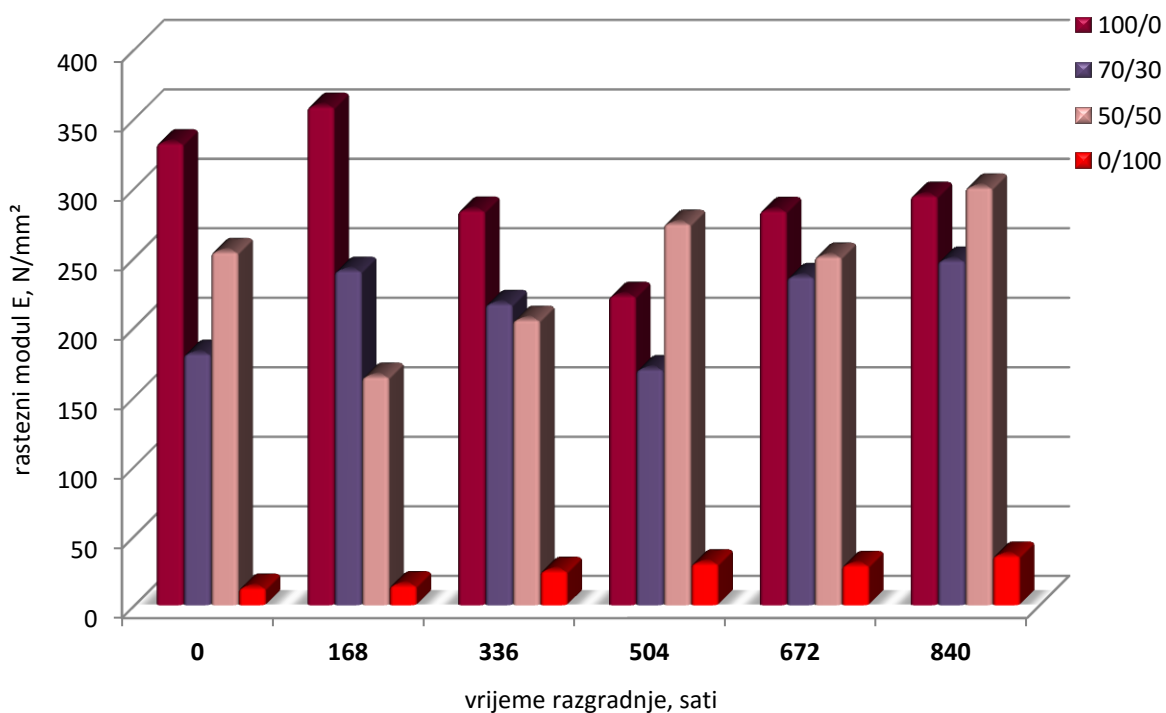


Slika 89. Vrijednosti prekidnog istežanja PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon određenog vremena razgradnje u lipazi *Candida cylindracea*

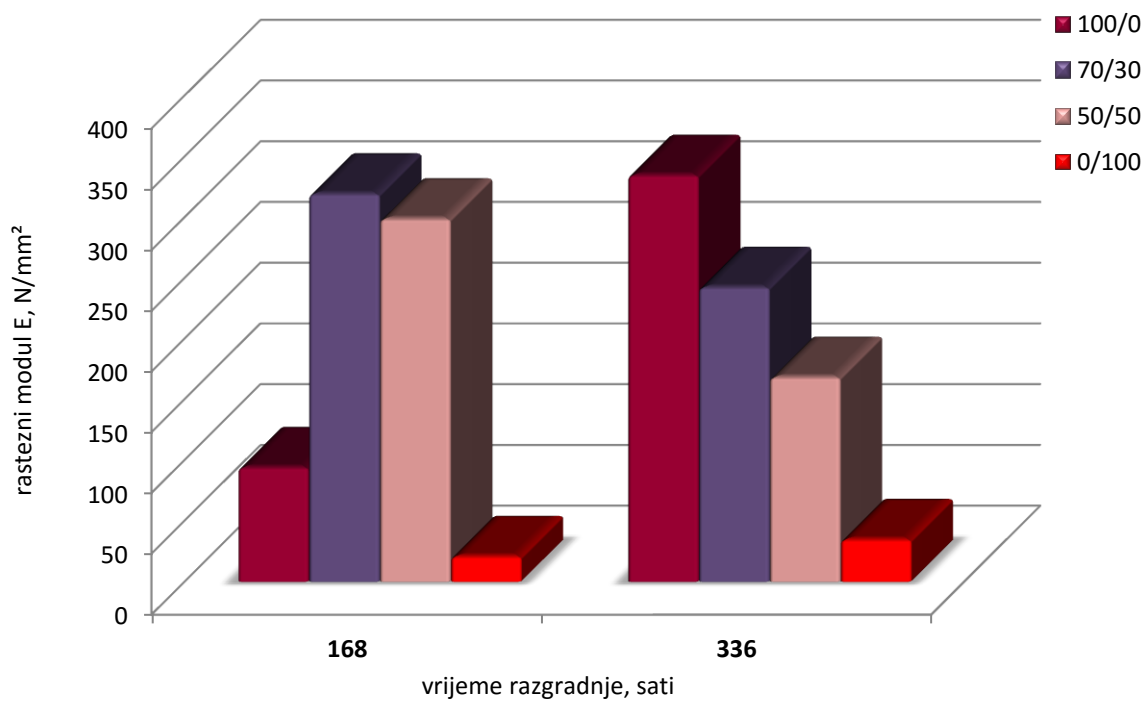


Slika 90. Vrijednosti prekidnog istezanja PCL/BW mješavina različitog sastava nakon određenog vremena razgradnje u lipazi *Thermomyces lanuginosus*

Na slikama 91-92. prikazane su vrijednosti rasteznog modula mješavina PCL polimera i BW-a tijekom razgradnje u otopini lipaze.



Slika 91. Vrijednosti rasteznog modula PCL/BW mješavina različitog sastava prije i nakon određenog vremena razgradnje u lipazi *Candida cylindracea*



Slika 92. Vrijednosti rasteznog modula PCL/BW mješavina različitog sastava nakon određenog vremena razgradnje u lipazi *Thermomyces lanuginosus*

5. ZAKLJUČAK

- Promjena mase PCL/BW mješavina različitog sastava tijekom 5 tjedana razgradnje u HBSS otopini lipaze *Candida cylindracea* ukazuje na razgradnju mehanizmom površinske erozije, što je potvrđeno djelovanje lipaze *Thermomyces lanuginosus*, znatno veće aktivnosti, tijekom 2 tjedna
- Veći gubitak mase uzoraka PCL/BW mješavine s većim udjelom PCL-a (70 %) nakon razgradnje u obje otopine lipaze, ukazuje na bržu difuziju vode zbog prisutne hidrofilnije PCL faze
- Kod PCL/BW mješavina starenih u otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus* uočavaju značajne promjene u strukturi
- Mjerenja kontaktnog kuta na površini PCL/BW mješavina različitog sastava pokazuju velike vrijednosti kontaktnog kuta, tj. slabe polarne interakcije. BW ima izrazito hidrofoban karakter, posljedično tome niske je polarnosti, odnosno niske površinske energije
- Parametri adhezije ukazuju na dobre interakcije između PCL i BW polimera
- Porastom udjela BW u PCL/BW mješavinama povećava se vrijednost kontaktnog kuta što ukazuje na preferirano smještanje BW komponente mješavine na površini
- Mjerenja kontaktnog kuta s vodom kod PCL/BW mješavina pokazuju porast hidrofobnost nakon 2. tjedana nakon enzimske razgradnje što je rezultat veće poroznosti strukture, a tijekom daljnje razgradnje dolazi do porasta hidrofilnosti
- FTIR-ATR spektroskopijom utvrđene su promjene u strukturi PCL/BW mješavina nakon enzimske razgradnje s lipazom. Prisutnost peptidnih veza ukazuje na vezanje enzima na površini PCL/BW mješavina
- Razgradnja mehanizmom površinske erozije PCL i BW polimer te PCL/BW mješavine potvrđena je i SEM analizom
- DSC analiza pokazuje promjenu porasta udjela kristalne faze tijekom enzimske razgradnje
- DSC analizom je utvrđeno da BW utječe na kristalnost PCL polimera, tj. razrušava kristalnu strukturu PCL-a
- TGA analizom je utvrđen jedan razgradni stupanj PCL/BW mješavina s manjim udjelom voska (do 50%) ukazuje na njihovu mješljivost
- Toplinska stabilnost PCL/BW mješavina ne mijenja se značajnije nakon enzimske razgradnje u otopini lipaze *Candida cylindracea* te lipaze *Thermomyces lanuginosus*, u vremenu do 5 tjedana i 2 tjedna
- PCL polimer povećava toplinsku stabilnost pčelinjeg voska (BW)

- Mehanička ispitivanja su pokazala sniženje vrijednosti prekidnih karakteristika PCL/BW mješavina nakon enzimske razgradnje s lipazom što ukazuje na dobru razgradnju u prisutnosti ovog enzima

6. LITERATURA

1. Zvonimir Janović, Polimerizacije polimeri/udžbenik, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera – Kemija u industriji, Zagreb, 1997.
2. Les H. Sperling, Introduction to Physical Polymer Science, Wiley Interscience, New Jersey, 2006.
3. Jyotishkumar Parameswaranpillai, Sabu Thomas, Yves Grohens, Polymer Blends: State of the Art, New Challenges, and Opportunities, Characterization of Polymer Blends: Miscibility, Morphology, and Interfaces, First Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015
4. Guobao Zhang, Jianming Zhang, Shenguo Wang, Deyan Shen, Miscibility and Phase Structure of Binary Blends of Polylactide and Poly(methyl methacrylate), Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics Vol. 41 23–30 (2003)
5. Lloyd M. Robeson, Polymer Blends, A Comprehensive Review, 11-23, <http://www.hanser.de/978-3-446-22569-5> (pristup: 23.04.2016.)
6. Wen-Bin Liao, Shih-Huang Tung, Wei-Chi Lai, Ling-Yueh Yang, Studies on blends of binary crystalline polymers: Miscibility and crystallization behavior in PBT/PAr (I27-T73), Polymer 47 (2006) 8380-8388.
7. Mohammed Abedalwafa, Fajun Wang, Lu Wang, Chaojing Li, Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review, Rev. Adv. Mater. Sci. 34 (2013) 123-140.
8. John C. Middleton, Arthur J. Tipton, Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, Biomaterials 21 (2000) 2335-2346.
9. Anders Höglund, Controllable degradation product migration from biomedical polyester-ethers, <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:11968/FULLTEXT01.pdf> (pristup: 14.04.2016.)
10. Lili Tan, Xiaoming Yu, Peng Wan, Ke Yang, Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review, J. Mater. Sci. Technol., (2013) 29(6), 503-513.
11. Helena S. Azevedo and Rui L. Reis, Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate, Ed. Rui L. Reis, Julio San Román, Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2004 CRC Press, 178-197.
12. G. Sivalingam, Giridhar 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.
13. John M. Colwell; Synthesis of Polycaprolactone Polymers for Bone Tissue Repair, School of Physical and Chemical Sciences (2006)
14. Debasish Mondal, May Griffith, Subbi S. Venkatraman, Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 65 (5) (2016) 255–265.
15. <http://www.slideshare.net/amirkraitzer/coronary-stent-design-part-b> (pristup: 15.04.2016.)
16. Peter Karlson, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1993, 20-89.

17. Tim Bugg, introduction to enzyme and coenzyme chemistry: Second edition, Blackwell Publishing Ltd, UK, 2004, 1-90
18. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4X9Y> (pristup: 17.04.2016.)
19. Shirley A. Bret, Kenneth P. Murphy, Protein Stability and Folding: Theory and Practice, Particle Sciences 8 (2009)
20. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=3QPC&opt=3&bionumber=1> (pristup: 17.04.2016.)
21. Cristiane D. Anobom, Anderson S. Pinheiro, Rafael A. De-Andrade, From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases, BioMed Research International, 2014 1-11 (2014), <http://dx.doi.org/10.1155/2014/684506> (pristup: 20.04.2016.)
22. Sona Hermanova, Jirina Omelkova, Stanislava Voberkova, Radka Balkova, Lukas Richtera, Lenka Mravcova i Josef Jančar, The effect of processing on polycaprolactone films on degradation process initiated by *Aspergillus oryzae* lipase, Int. J. of Polymer Anal. Charact., 17 (2012) 465-475.
23. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=4LIP&bionumber=1> (pristup: 21.04.2016.)
24. Erhan Ozsagiroglu, Banu Iyisan, Yuksel Avcibasi Guvenilir, Comparing the In -Vitro Biodegradation Kinetics of Commercial and Synthesized Polycaprolactone Films in Different Enzyme Solutions, Ekoloji 22 (86) (2013) 90-96.
25. Castilla-Cortázar, Jorge Más-Estellés, Jose M. Meseguer-Dueñas, Jorge L. Escobar Ivirico, Bartomeu Marí, Antonio Vidaurre, Hydrolytic and enzymatic degradation of a Poly(ϵ -caprolactone) network, Polymer Degradation and Stability 97 (8) (2012) 1241–1248.
26. Jin Qianru, JiaGuoqing, Wang Xiuli, Li Can, Comparison of the salt-induced activation of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media by phosphate buffer and sodium sulfate, Chinese Journal of Catalysis 34 (2013) 1224–1231.
27. Hui Peng, Jun Ling, Jinzhi Liu, Ning Zhu, Xufeng Ni, Zhiquan Shen, Controlled enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers in the presence of porcine pancreatic lipase, Polymer Degradation and Stability 95 (2010) 643-650.
28. A. P. Tulloch, The composition of beeswax and other waxes, National Research Council of Canada, 5, 247 – 258 (1970)
29. Stefan Bogdanov, Beeswax: Uses and Trade, The Beeswax Book, Chapter 1, Bee Product Science, September 2009 1, 1-16. www.bee-hexagon.net (pristup: 21.04.2016.)
30. <https://rdevineskincare.com/beeswax-the-skin-protector-r-devine-skin-care/> (pristup: 21.04.2016.)
31. <http://www.beeswaxco.com/bees-making-wax.php> (pristup: 21.04.2016.)
32. Robert Buchwald, Alan R. Greenberg i Michael D. Breed, A Biomechanical Perspective on Beeswax, American Entomologist, Volume 51, Number 1, 39-41.
33. Vera Kovačević, Adhezija i adhezijski proizvodi, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Interna skripta, Zagreb, 2013.
34. Mirela Leskovic, Karakterizacija i identifikacija proizvoda, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, predavanja, Zagreb, 2015.
35. Sanja Lučić-Blagojević, Adhezija i adhezijski proizvodi, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, predavanja, Zagreb, 2015.

36. <http://www.klik.hr/hotcool/kopiranje-priode> (pristup: 15.04.2016.)
37. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry, Thermo Nicolet Corporation, 2001. (<http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>) (pristup: 17.04.2016.)
38. Nikola Bilškov, Mjerenje optičkih konstanti u srednjem infracrvenom području, *Kemija u industriji*, 59 (1) 11–18 (2010)
39. <https://www.purdue.edu/epps/rem/rs/sem.htm> (pristup: 28.04.2016.)
40. Emi Govorčin-Bajsić, Karakterizacija i identifikacija proizvoda, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, predavanja, Zagreb, 2015.
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2977967/> (pristup: 20.04.2016.)
42. Raheleh Safaeijavan, Masoud Soleimani, Adeleh Divsalar, Akram Eidi, Abdolreza Ardeshirylajimi, Biological behavior study of gelatin coated PCL nanofiberous electrospun scaffolds using fibroblasts, *Journal of Paramedical Sciences*, Vol.5, No.1 2014
43. Bwirw S. Ndazi, Sten Karlsson, *eXPRESS Polymer Letters* 5 (2) (2011) 119-131
44. Lidija Svečnjak, Goran Baranović, Marko Vinceković, Saša Prđun, Dragan Bubalo, Ivana Tlak Gajger, An approach for routine analytical detection of beswax adulteration using FTIR-ATR spectroscopy, *Journal Appl. Sci.* Vol. 59 No. 15 2015
45. Steven J. Barnes, Lawrence P. Harris, *Tissue Engineering Roles, Materials and Applications*, Nova Science Publishers, Inc. (2008)

7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

PCL	poli(ϵ -kaprolakton)
PLA	poli(laktid)
PGA	poli(glikolid)
BW	pčelinji vosak (<i>eng. beeswax</i>)
PCL/BW	mješavine poli(ϵ -kaprolakton) i pčelinjeg voska
Ser	serin
Asp	asparagin
Glu	glutamin
His	histidin
HBSS	Hankova otopina soli (<i>eng. Hank's balanced salt solution</i>)
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
TGA	termogravimetrijska analiza
FTIR	Fourier transformirana infracrvena spektroskopija
IR/ATR	infracrvena spektroskopija, prigušena totalna refleksija (<i>eng. Attenuated total reflection</i>)
SEM	pretražna elektronska mikroskopija (<i>eng. Scanning electron microscopy</i>)
θ	kontaktni kut ($^{\circ}$)
ν	valni broj (cm^{-1})
w	maseni udio (%)
Δm	promjena mase (%)
m_0	masa u vremenu 0 ili početna masa (g)
m_t	masa u vremenu t (g)
m_v	masa mokrog uzorka (g)
GM	gubitak mase (%)
Δm_v	apsorbirana voda (%)
γ	slobodna površinska energija (mJ m^{-2})
γ^d	disperzijska komponenta slobodne energije površine (mJ m^{-2})
γ^p	polarana komponenta slobodne energije površine (mJ m^{-2})

γ_{SL}	slobodna međupovršinska energija (mJ m^{-2})
S	koeficijent razlijevanja
W_A	termodinamički rad adhezije (mJ m^{-2})
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
T_g	temperatura staklastog prijelaza ili staklište ($^{\circ}\text{C}$)
T_c	temperatura kristalizacije ($^{\circ}\text{C}$)
T_m	temperatura taljenja ($^{\circ}\text{C}$)
T_d	temperatura razgradnje ($^{\circ}\text{C}$)
T_{max}	temperatura pri maksimalnoj brzini razgradnje ($^{\circ}\text{C}$)
T_{onset}	temperatura početka razgradnje ($^{\circ}\text{C}$)
T_{end}	temperatura kraja razgradnje ($^{\circ}\text{C}$)
ΔG	slobodna Gibbsova energija
ΔH_m	entalpija taljenja (J g^{-1})
ΔH_m^0	entalpija taljenja 100 % polimera (J g^{-1})
ΔH_c	entalpija kristalizacije (J g^{-1})
X_c	stupanj kristalnosti (%)
C_p	toplinski kapacitet (J g^{-1})
ΔC_p	specifični toplinski kapacitet ($\text{J g}^{-1}\text{K}^{-1}$)
σ_p	prekidna čvrstoća (N mm^{-2})
σ_v	vlačna čvrstoća (N mm^{-2})
ϵ_p	prekidno istezanje (%)
ϵ_v	vlačno istezanje (%)
E	modul elastičnosti ili Youngov modul (N mm^{-2})
W	rad (N mm)

ŽIVOTOPIS

Mirna Vujnović rođena je 16. srpnja 1992. godine u Rijeci. Osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića pohađala je u Vrbovskom. 2007. godine upisuje Opću gimnaziju Bernardina Frankopana u Ogulinu, gdje je zanimanje za prirodne i tehničke znanosti sve više raslo. 2011. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo te 2014. godine stječe titulu prvostupnika (bakalaureus) kemijskog inženjerstva. Diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijsko procesno inženjerstvo upisuje 2014. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Od 2013. godine član je Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije izrađuje individualni znanstveni rad u kategoriji jedan ili dva autora te u lipnju 2016. godine dobiva Rektorovu nagradu Sveučilišta u Zagrebu. U lipnju 2016. godine sudjeluje na V. hrvatskom simpoziju o kemiji i tehnologiji makromolekula koji se održavao u Hrvatskoj gospodarskoj komori u Zagrebu. Sudjelovala je na XI. Ružičkinim danima u Vukovaru u rujnu 2016. godine, s radovima izrađenim na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.