

# Priprava i karakterizacija biokompozita na osnovi polilaktida (PLA) i bakterijske nanoceluloze (BNC)

<https://doi.org/10.15255/KUI.2019.064>

KUI-18/2020

Izvorni znanstveni rad

Prispjelo 30. prosinca 2019.

Prihvaćeno 3. svibnja 2020.

N. Mrkonjić,<sup>a\*</sup> G. Martinko,<sup>a</sup> E. Govorčin Bajsčić,<sup>a</sup>  
I. Slivac,<sup>b</sup> V. Špada<sup>c</sup> i T. Holjevac Grgurić<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Hrvatska

<sup>b</sup>Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Hrvatska

<sup>c</sup>Centar za istraživanje materijala Istarske županije – METRIS, Hrvatska

<sup>d</sup>Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet Sisak, Hrvatska

Ovo djelo je dano na korištenje pod  
Creative Commons Attribution 4.0  
International License



## Sažetak

Polilaktidna kiselina (PLA) i bakterijska nanoceluloza (BNC) zbog svoje biorazgradljivosti, biokompatibilnosti i netoksičnosti imaju velik potencijal za primjenu u biomedicini. Cilj ovog rada bio je pripremiti i ispitati biokompozit PLA/BNC. Istražen je utjecaj BNC-a na morfološku strukturu, kemijski sastav, toplinska svojstva, toplinsku postojanost i hidrofobnost PLA te zasijanje i rast stanica biokompozita PLA/BNC primjenom pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM), infracrvene spektroskopije (FTIR), diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) i termogravimetrijske analize (TGA) te određivanjem kontaktnog kuta i metodom MTT. Dodatkom BNC-a u PLA dolazi do pomaka staklišta ( $T_g$ ) prema nižim temperaturama, što ukazuje na veću pokretljivost amorfnе faze PLA te porasta stupnja kristalnosti zbog nukleacijskog učinka celuloze. Početak toplinske razgradnje pomaknut je na niže temperature u odnosu na čisti PLA, što ukazuje na smanjenje toplinske postojanosti PLA dodatkom BNC-a. Biokompozit PLA/BNC pokazuje poroznu, vlaknastu strukturu. Test zasijavanja stanica pokazao je da je biokompozit PLA/BNC pogodan za prihvatanje i rast humanih stanica, pa je prema tome potencijalno primjenjiv u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu.

## Ključne riječi

Polilaktidna kiselina, bakterijska nanoceluloza, biokompoziti, biomedicina, tkivno inženjerstvo

## 1. Uvod

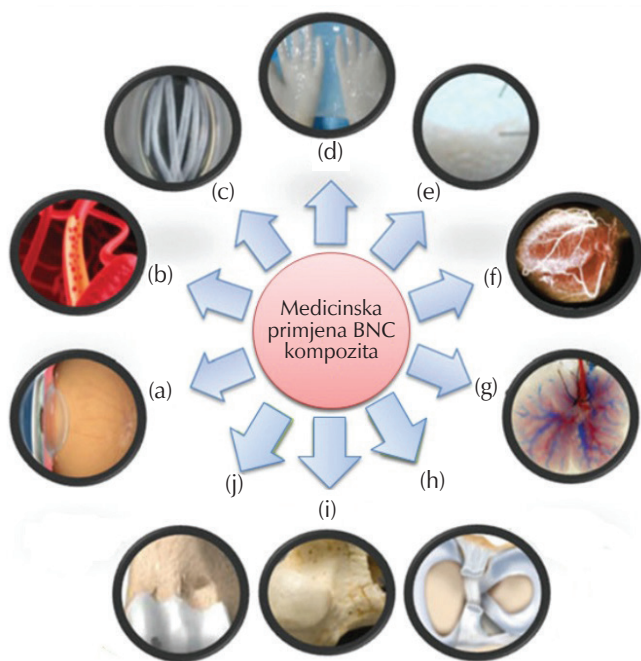
Danas se s ciljem zaštite okoliša sve više provode istraživanja vezana uz razvoj novih, biorazgradljivih i za okoliš prihvatljivih materijala koji se mogu dobiti iz prirodnih izvora poput celuloze, kolagena, svile ili pamuka. Biomaterijali zauzimaju značajno mjesto u biomedicini zbog svoje netoksičnosti, biokompatibilnosti, biorazgradljivosti u organizmu, poroznosti te mogućnosti adhezije stanica. Upotrebljavaju se za zamjenu oštećenog tkiva kao što je kost, hrskavica i koža, kao umjetni organi, za prijenos i kontrolirano otpuštanje lijekova, kao ortopedski pomagala itd. Da bi takvi materijali bili primjenjivi u biomedicinske svrhe, važno je istražiti njihov utjecaj na održivost, rast i funkciju stanica.<sup>1–3</sup> U području tkivnog inženjerstva biomaterijali se upotrebljavaju kao privremeni nosači na/u koje se zasijavaju stanice prije transplantacije i kao takvi unapređuju reorganizaciju stanica za stvaranje funkcionalnog tkiva.<sup>4</sup> Trenutačno se kao nosači najviše primjenjuju polilaktid (PLA), poliglikolna kiselina (PGA), polikaprolakton (PCL) i polilaktidno-glikolna kiselina (PLGA). Polilaktid (PLA) je razgradljiv i biokompatibilan polimer i prilikom njegove razgradnje najčešće nastaju netoksični produkti te se upotrebljava za izradu nosača u području tkivnog inženjerstva i to za koštano, hrskavičnu, tetivnu, neuralnu i vaskularnu regeneraciju. PLA ima visok stupanj kristalnosti što znatno utječe na njegova svojstva.<sup>5,6</sup> Najrasprostranjeniji je prirod-

ni polimer koji se nalazi u biljkama, a može se dobiti i sintezom iz bakterija je celuloza. Bakterijsku nanocelulozu (BNC) u čistom obliku proizvode bakterije octene kiseline među kojima je najviše proučavana aerobna gram-negativna bakterija *Acetobacter xylinum*.<sup>7</sup> Bakterijska nanoceluloza dobiva se postupkom biosinteze. BNC se sastoji samo od monomera glukoze, ima umreženu strukturu, biorazgradljiv je, nije topljiv u vodi, ali u njoj bubri i postaje hidrogel. Navedena svojstva omogućavaju upotrebu BNC-a kao podloge za rast i diferencijaciju stanica, zbrinjavanje rana, obnovu hrskavice, regeneraciju krvnih žila i kostiju, u farmaciji kao nosača za prijenos lijekova i kozmetici (slika 1).<sup>8–10</sup>

Primjena stanica *in vitro* standardni je postupak fundamentalnih biomedicinskih istraživanja i prvi korak u istraživanju biokompatibilnosti materijala s potencijalnom primjenom u tkivnom inženjerstvu. U tu svrhu upotrebljava se mnoštvo staničnih vrsta od kojih klinički najznačajnije rezultate daju one primarne, tj. izravno izolirane iz organizama donora. Dobra zamjena za primarne stanice su diferencirane matične stanice. Međutim, kako nijedne od te dvije skupine stanica nisu lako dostupne, a i njihov uzgoj je još uvijek prilično skup, već se desetljećima kao alternativa upotrebljavaju besmrtnе stanične linije koje su u određenoj mjeri zadržale svojstva tkiva odakle potječu. Danas ih ima na desetine vrsta. Stanična linija HaCaT predstavlja spontano imortalizirane ljudske keratinocite izolirane iz odrasle osobe. Radi se o vrlo pouzdanom staničnom modelu za istraživanje toksičnih učinaka raznih spojeva kao i regenerativnih svojstava kože jer su stanice monoklonske, netumorigenične i pokazuju specifične markere diferencijacije.<sup>11–13</sup>

\* Autor za dopisivanje: Nikolina Mrkonjić, mag.ing. oecojng.  
e-pošta: [nmrkonjic@fkit.hr](mailto:nmrkonjic@fkit.hr)

Rad je prezentiran na VII. hrvatskom simpoziju o kemiji i tehnologiji makromolekula 2019.



Slika 1 – Primjena kompozita BNC u biomedicinske svrhe: a) rožnica, b) krvne žile, c) uretra, d) koža, e) nosač, f) srčani zalisci, g) jetra, h) meniskus, i) kost, j) hrskavica<sup>10</sup>

Fig. 1 – Biomedical application of the BNC composite: a) cornea, b) blood vessels, c) urethra, d) skin, e) scaffold, f) heart valves, g) liver, h) meniscus, i) bone, j) cartilage<sup>10</sup>

Cilj ovog rada bio je pripremiti polimerni biokompozit na osnovi polilaktida (PLA) i bakterijske nanoceluloze (BNC) te vidjeti kako BNC djeluje na strukturu i svojstva PLA. Na temelju provedenih preliminarnih istraživanja želi se utvrditi mogućnost upotrebe dobivenog biokompozita PLA/BNC u medicini kao kandidata za regeneraciju tkiva.

## 2. Eksperimentalni dio

### 2.1. Materijali

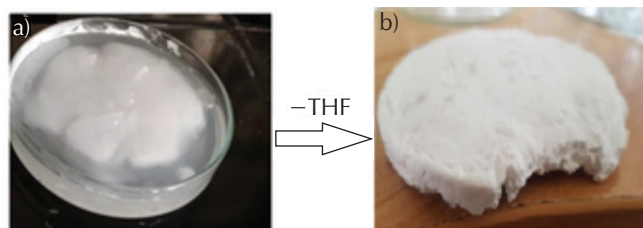
Za pripremu biokompozita PLA/BNC upotrijebljen je polilaktid (PLA Luminy L 175) proizvođača Total Corbion, Tajland, MFR = 3 g/10 min, gustoće 1,24 g cm<sup>-3</sup>, bakterijska nanoceluloza u obliku hidrogela (BNC-Nata de Coco, Philippines, Indonezija), natrijev hidroksid (NaOH) i tetrahidrofuran (THF), proizvođača Lachner.

### 2.2. Pročišćavanje bakterijske nanoceluloze

Prije pripreme PLA/BNC biokompozita provedeno je pročišćavanje kockica Nata de Coco hidrogela u 0,1 M otopini NaOH u vremenu od 20 min pri 100 °C da bi se uklonili prisutni šećeri i bakterije. Nakon pročišćavanja kockice su isprane destiliranom vodom do neutralne pH vrijednosti.

### 2.3. Priprema biokompozita PLA/BNC

Za pripremu biokompozita PLA/BNC najprije je pripremljena polimerna otopina otapanjem 7 g granula PLA u 15 ml tetrahidrofurana (THF) uz miješanje na magnetskoj miješalici pri brzini od 950 o min<sup>-1</sup> i temperaturi 61 °C. U dobivenu polimernu otopinu PLA dodan je prethodno pročišćen i nožem usitnjen na manje ploške BNC mase 0,85 g. Postupak pripreme biokompozita PLA/BNC prikazan je na slici 2a. Dobiveni biokompozit PLA/BNC ima poroznu strukturu (slika 2b).



Slika 2 – a) polimerna otopina + usitnjeni BNC i b) biokompozit PLA/BNC

Fig. 2 – a) Polymer solution + BNC and b) PLA/BNC biocomposite

### 2.4. Karakterizacija uzoraka

#### 2.4.1. FTIR-ATR spektroskopija

Za određivanje promjena u kemijskoj strukturi provedena je FTIR-ATR spektroskopija na instrumentu FTIR Spectrum One, Perkin Elmer uz ATR komoru. Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi u području valnih brojeva od 4000 do 650 cm<sup>-1</sup> uz vrijednosti spektralne rezolucije 4 cm<sup>-1</sup>. Snimanje svakog uzorka ponovljeno je 10 puta, a dobiveni spektri predstavljaju njihovu srednju vrijednost. Uzorci su snimljeni u svojem osnovnom obliku, bez prethodne pripreme.

#### 2.4.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Fazni prijelazi PLA, BNC i biokompozita PLA/BNC određeni su na DSC instrumentu Mettler Toledo DSC 822<sup>e</sup>. Uzorci mase od oko 10 mg analizirani su u struji dušika (40 ml min<sup>-1</sup>) uz brzinu zagrijavanja i hlađenja od 10 °C min<sup>-1</sup> u temperaturnom području od -100 °C do 250 °C, kroz dva ciklusa zagrijavanja i hlađenja. Uzorci su držani 5 min na temperaturi 250 °C da bi se eliminirala toplinska povijest uzorka u postupku pripreme. Hlađenje na -100 °C provedeno je tekućim dušikom.

Stupanj kristalnosti ( $\chi_c$ ) za čisti uzorak PLA i biokompozit PLA/BNC izračunat je prema izrazu (1):<sup>14</sup>

$$\chi_c = \frac{\Delta H_t^0}{\Delta H_t^{100} \cdot W_{PLA}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

pri čemu je  $\Delta H_t^0$  entalpija taljenja očitana iz DSC krivulje zagrijavanja,  $\Delta H_t^{100}$  entalpija taljenja za 100 % kristalni PLA

i prema literaturi iznosi  $93,6 \text{ J g}^{-1}$ ,<sup>14</sup> a  $W_{\text{PLA}}$  maseni udio PLA.

#### 2.4.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Toplinska postojanost PLA, BNC i biokompozita PLA/BNC određena je na instrumentu Q500, TA Instruments. Uzorci mase od oko 10 mg zagrijavani su u struji dušika ( $60 \text{ ml min}^{-1}$ ) uz brzinu zagrijavanja od  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , u temperaturnom području od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $700 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.4. Izgled površine uzoraka – SEM mikroskopija

Izgled površine PLA, BNC i biokompozita PLA/BNC promatran je pretražnim elektronskim mikroskopom SEM QUANTA 250, FEI, bez nanošenja sloja zlata.

#### 2.4.5. Mjerenje kontaktnog kuta s vodom

Kontaktni kut određen je metodom viseće kapi (*Sessile drop*) pomoću uređaja za mjerenje kontaktnog kuta, DataPhysics OCA 20 Instruments GmbH. Volumen kapljice vode koja se nanosila na uzorke varirao je od  $1,000 \mu\text{l}$  do  $5,000 \mu\text{l}$ . Na svaki uzorak nanosene su tri kapljice vode te je nakon 20 s mjereno kontaktni kut.

#### 2.4.6. Zasićavanje stanica na biokompozit PLA/BNC

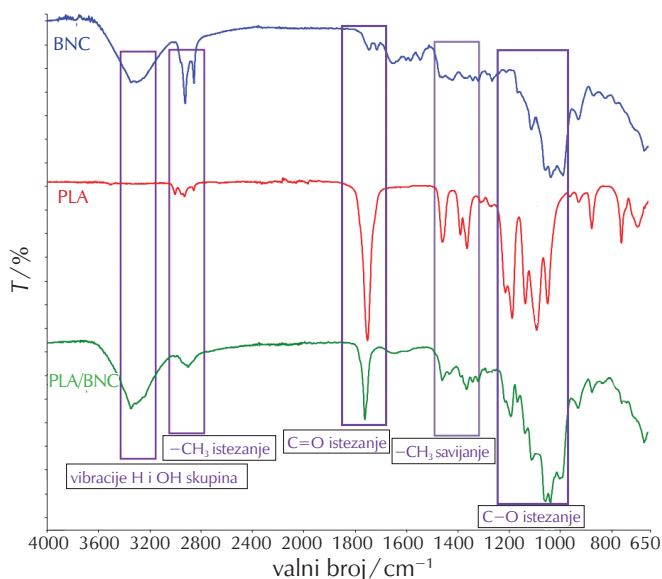
Stanična linija HaCaT nabavljena je od *Cell Line Services GmbH* (Eppelheim, Njemačka). Radi se o adherentnim stanicama koje se uzgajaju statično u sterilnim Petrijevim zdjelicama, u standardnom hranjivom mediju DMEM (*Capricorn Scientific*) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (10 %) i antibiotika (*Invitrogen*). DMEM medij, jedan od standardnih hranjivih medija za uzgoj stanica *in vitro*, sadrži puferiranu otopinu glukoze, vitamina, aminokiselina i anorganskih soli. Uzgoj se obavljao u inkubatoru pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  i vlažnoj atmosferi od 95 % zraka i 5 %  $\text{CO}_2$ . Prilikom zasićavanja na nosače od biokompozita PLA/BNC stanice su tripsinom odvojene s površine Petrijeve zdjelice i zatim resuspendirane u mediju do koncentracije  $5 \cdot 10^5$  stanica/ml. Određivanje broja stanica obavljeno je tripan-plavo metodom u Neubauerovom hemocitmetru pomoću optičkog mikroskopa. Nosači od biokompozita PLA/BNC za zasićavanje stanica oblikovani su škarama u diskove promjera oko  $1,6 \text{ cm}$  te su postavljeni u jažice ploča za uzgoj (*24-well plate*). Diskovi su močeni preko noći u PBS-u, a zatim sljedećeg jutra sterilizirani 70 %-im etanolom i stavljeni pod UV svjetlo 30 min. Etanol je uklonjen a diskovi su zatim dvaput isprani puferom PBS i kondicioniranim hranjivim medijem. Na tako priređene nosače dokapana je suspenzija stanica HaCaT, 500,000 stanica po nosaču. Ploče za uzgoj su zatim postavljene u inkubator kako bi se stanice prihvatile za nosače i započele s rastom. Nakon 6 h nosači su izdvojeni u nove jažice sa svježe dodanim medijem i uzgoj prihvaćenih stanica je nastavljen sljedećih 48 h. Za određivanje prihvaćanja i rasta stanica na nosačima primijenjena je tzv. metoda MTT bazirana na sposobnosti živih stanica da svojim oksidoredukcijskim reakcijama me-

tabolizma prevedu vodotopljiv spoj (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, tj. MTT) žute boje u tamnoplave netopljive kristaliće formazana. U tu svrhu pripravljena je 5 % otopina MTT u DMEM mediju, koja je zatim sterilizirana  $0,2 \mu\text{m}$  filtracijom. Otopina MTT-a dodana je na diskove sa stanicama 48 h nakon zasićavanja. Kao kontrola poslužio je disk nezasićen stanicama. Plava boja formazana na diskovima sa stanicama razvila se nakon 3 h inkubacije pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 3. Rezultati i rasprava

### 3.1. Rezultati dobiveni FTIR-ATR spektroskopijom

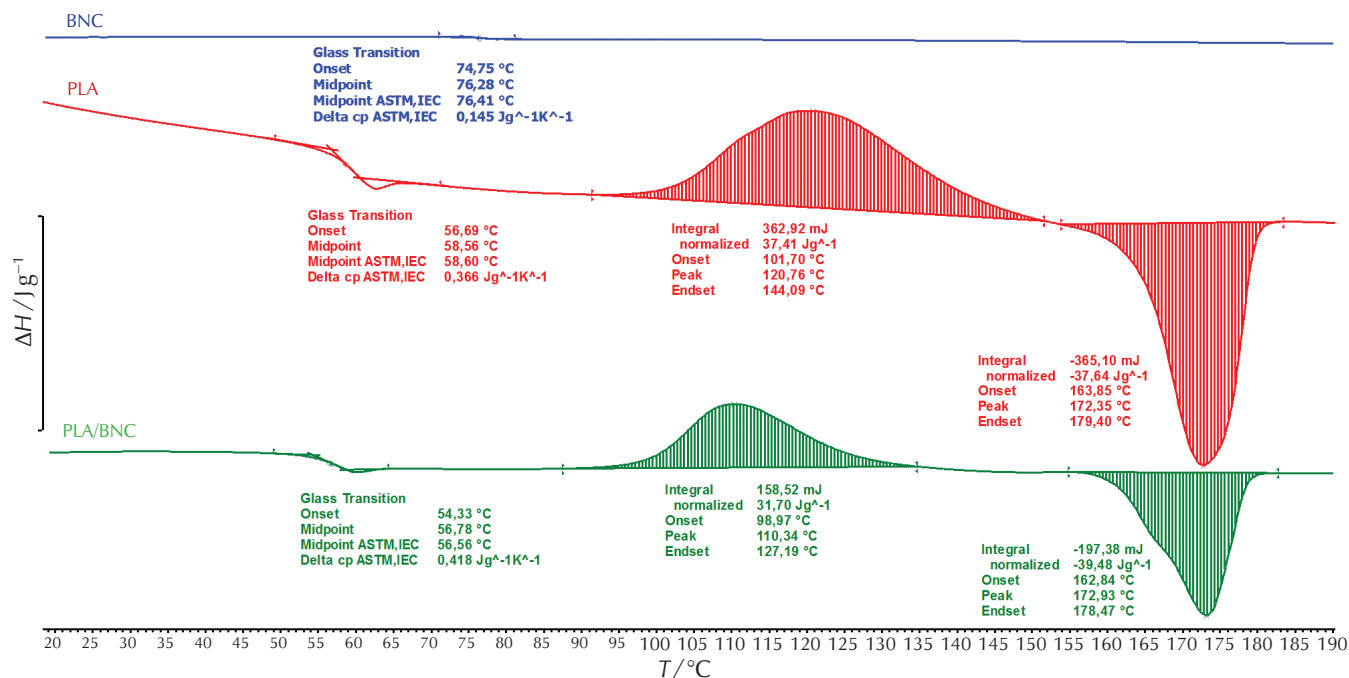
FTIR-ATR je jednostavna i vrlo korisna tehnika kojom je određena struktura čistih komponenata PLA i BNC kao i biokompozita PLA/BNC. Na FTIR spektru BNC-a (Nata de Coco) (slika 3) javlja se karakteristična vrpca pri  $3344 \text{ cm}^{-1}$  koja odgovara savijanju H veze u  $-\text{OH}$  skupini. Apsorpcijska vrpca pri  $2919 \text{ cm}^{-1}$  vezana je za simetrično istezanje  $-\text{CH}$  veze  $\beta$ -celuloze.<sup>15</sup> Pri  $1652 \text{ cm}^{-1}$  dobivena je apsorpcijska vrpca koja se pripisuje apsorbaranoj vodi u kristalnoj fazi celuloze.<sup>15</sup> Vrpca pri  $1160 \text{ cm}^{-1}$  odgovara asimetričnom istezanju  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  skupine, dok apsorpcijske vrpce pri  $1052$  i  $1031 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju istezanju skupine  $\text{CO}$ .<sup>15</sup>



Slika 3 – FTIR-ATR spektar za BNC (Nata de Coco), PLA i biokompozit PLA/BNC

Fig. 3 – FTIR-ATR spectra of BNC (Nata de Coco), PLA and PLA/BNC biocomposite

FTIR spektar za PLA prikazan je na slici 3. Javljaju se karakteristične vrpce pri  $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  te  $1300 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  vezane za istezanje i savijanje skupine  $-\text{CH}_3$ .<sup>16</sup> Apsorpcijske vrpce pri  $2998 \text{ cm}^{-1}$  i  $2948 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju asimetričnom odnosno simetričnom istezanju  $\text{CH}_3$ ,<sup>17,18</sup> dok vrpce pri  $1454 \text{ cm}^{-1}$  i  $1358 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju asimetričnom i simetričnom savijanju  $-\text{CH}_3$ .<sup>19</sup> Vrpca pri  $1746 \text{ cm}^{-1}$



Slika 4 – DSC krivulje zagrijavanja za BNC, PLA i biokompozit PLA/BNC  
 Fig. 4 – DSC heating curves of BNC, PLA and PLA/BNC biocomposite

prispije se istezanju karbonilne skupine (C=O), dok su apsorpcijske vrpce vidljive pri 1183, 1086, 1044  $\text{cm}^{-1}$  vezane za istezanje C–O skupine.<sup>20</sup> Vibracije pri nižim valnim brojevima (868, 755 i 693  $\text{cm}^{-1}$ ) odgovaraju istezanju C–C jednostruke veze.<sup>20</sup>

Na FTIR spektru biokompozita PLA/BNC koji je prikazan na slici 3 vidljive su vrpce pri 3300 i 3344  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju vibracijama vezanim za H i OH skupine u BNC-u. Također se javljaju apsorpcijske vrpce pri: 1646  $\text{cm}^{-1}$  (apsorbirana voda u kristalnoj fazi celuloze), 1161  $\text{cm}^{-1}$  (asimetrično istezanje C–O–C skupine) i 1054  $\text{cm}^{-1}$  (istezanju CO skupine). Osim vrpce karakterističnih za BNC, u biokompozitu PLA/BNC prisutne su i apsorpcijske vrpce vezane za PLA, ali uz smanjeni intenzitet. Vidljive su: apsorpcijska vrpca pri 1757  $\text{cm}^{-1}$  vezana za istezanje karbonilne skupine (C=O), vrpce pri 1455  $\text{cm}^{-1}$  i 1359  $\text{cm}^{-1}$  vezane za asimetrično i simetrično savijanje  $-\text{CH}_3$  te vrpce pri 1187, 1033  $\text{cm}^{-1}$  vezane za istezanje C–O skupine.

### 3.2. Rezultati dobiveni diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC)

S ciljem određivanja utjecaja BNC-a na fazne prijelaze u biokompozitu PLA/BNC provedena su DSC mjerenja. DSC krivulje dobivene nakon drugog ciklusa zagrijavanja za čisti BNC, čisti PLA te biokompozit PLA/BNC prikazane su na slici 4, a karakteristične vrijednosti (temperatura staklastog prijelaza,  $T_g$ , ekstrapolirana početna temperatura taljenja,  $T_{p,tr}$  temperatura u minimumu pika taljenja,  $T_{m,tr}$  ekstrapolirana konačna temperatura taljenja,  $T_{k,tr}$  ekstrapolirana

četna temperatura hladne kristalizacije,  $T_{p,cc}$ , temperatura u maksimumu pika hladne kristalizacije,  $T_{m,cc}$  te ekstrapolirana konačna temperatura hladne kristalizacije,  $T_{k,cc}$ ) očitane iz krivulja prikazane su u tablici 1. Na DSC krivulji dobivenoj nakon drugog ciklusa zagrijavanja za uzorak BNC-a vidljiva je samo pojava  $T_g$  na 76 °C vezanog za amorfnu strukturu BNC-a.

PLA je kristalast polimer, što znači da sadrži amorfnu i kristalnu fazu te su njegova toplinska svojstva određena udjelom tih faza kao i molekulskom masom PLA. Na DSC krivulji jasno se uočavaju tri prijelaza koja odgovaraju temperaturi staklastog prijelaza ( $T_g$ ), hladnoj kristalizaciji ( $T_{cc}$ ) i taljenju ( $T_l$ ). Temperatura staklastog prijelaza  $T_g$  za čisti PLA javlja se pri 59 °C, odmah nakon  $T_g$ -a javlja se egzotermni pik vezan za hladnu kristalizaciju PLA pri 121 °C i endotermni pik vezan za taljenje kristalne faze PLA pri 172 °C.

Na DSC krivulji dobivenoj za biokompozit PLA/BNC dolazi do pojave tri faza prijelaza ( $T_g$ ,  $T_{cc}$  i  $T_l$ ). Dodatkom BNC-a u PLA dolazi do neznatnog pomaka  $T_g$  na nižu temperaturu (s 59 na 57 °C) u odnosu na čisti PLA, što ukazuje na povećanje pokretljivosti amorfne faze PLA dodatkom i smještanjem amornog BNC-a u amorfnu fazu PLA. Takva neznatna promjena  $T_g$  biokompozita PLA/BNC u odnosu na čisti PLA u skladu je s literaturnim podatcima.<sup>14</sup> Također dodatkom BNC-a ne mijenja se značajno  $T_{m,t}$  biokompozita PLA/BNC u odnosu na čisti PLA (sa 172 na 173 °C), a  $T_{p,t}$  se smanjuje (sa 164 na 161 °C). Međutim, dodatak BNC-a dovodi do značajnog pomaka  $T_{m,cc}$  u biokompozitu sa 121 na 110 °C, a hladna kristalizacija biokompozita započinje pri nižoj temperaturi (99 °C) u odnosu na čisti PLA (101 °C). Prema istraživanjima Khooa, Boruvka i ostalih

Tablica 1 – DSC rezultati nakon drugog ciklusa zagrijavanja za PLA, BNC i biokompozit PLA/BNC

Table 1 – DSC results after 2<sup>nd</sup> heating cycle for PLA, BNC, and PLA/BNC biocomposite

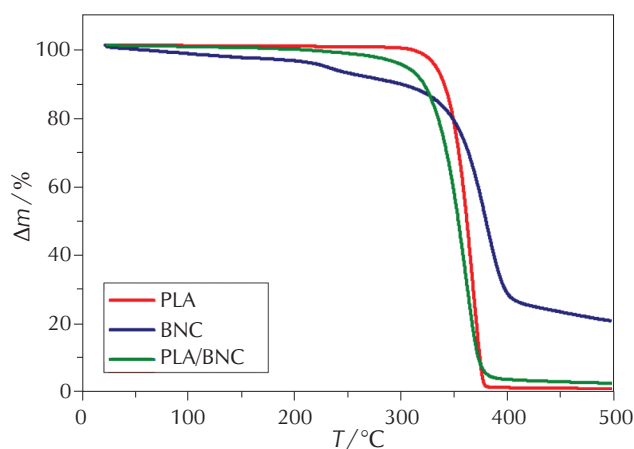
Uzorak Sample	$T_g/^\circ\text{C}$	$T_{p,cc}/^\circ\text{C}$	$T_{m,cc}/^\circ\text{C}$	$T_{k,cc}/^\circ\text{C}$	$T_{p,t}/^\circ\text{C}$	$T_{m,t}/^\circ\text{C}$	$T_{k,t}/^\circ\text{C}$	$\Delta H_t/\text{J g}^{-1}$	$\chi_c/\%$
BNC	76	–	–	–	–	–	–	–	–
PLA	59	101	121	145	164	172	180	37,6	40
PLA/BNC	57	99	110	128	161	173	179	39,5	47

autora<sup>14,21</sup> celuloza u PLA može djelovati kao heterogeni nukleus te potaknuti kristalizaciju lanaca PLA pri nižoj temperaturi. Također, dodatkom BNC-a stupanj kristalnosti,  $\chi_c$  čistog PLA raste s 40 % na 47 %, što se pripisuje djelovanju celuloze kao nukleacijskog agensa.<sup>14,21</sup>

### 3.3. Rezultati TGA analize

Biorazgradljivi materijali razgrađuju se pri nižim temperaturama i pokazuju manju toplinsku postojanost u usporedbi sa sintetskim polimerima. Stoga je vrlo važno ispitati toplinsku postojanost takvih materijala, a tehnika koja se u tu svrhu primjenjuje je termogravimetrijska analiza (TGA). U ovom radu TGA analizom ispitana je toplinska postojanost čistog BNC-a, čistog PLA i biokompozita PLA/BNC s ciljem određivanja utjecaja BNC-a na toplinsku postojanost PLA.

Krivulje TG i DTG za čisti BNC, čisti PLA te njihov biokompozit prikazane su na slikama 5 i 6, a vrijednosti dobivene iz krivulja prikazane su u tablici 2.

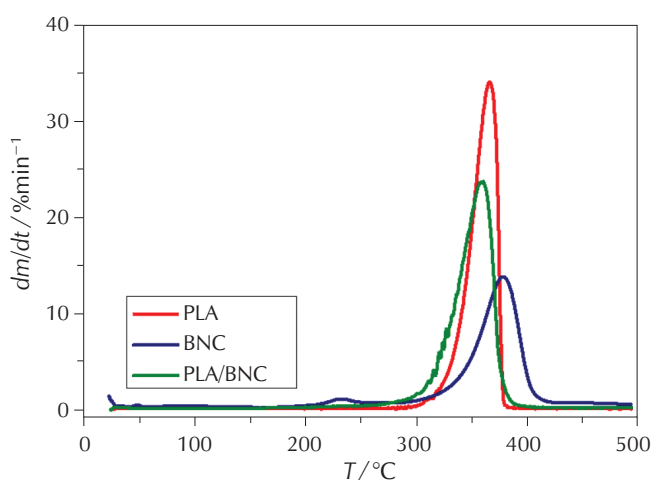


Slika 5 – TG krivulje za PLA, BNC i biokompozit PLA/BNC

Fig. 5 – TG curves for PLA, BNC and PLA/BNC biocomposite

Na krivulji TG (slika 5, tablica 2) vidljivo je da toplinska razgradnja BNC-a započinje pri 211 °C, a kraj razgradnje joj je pri 400 °C. Na temperaturi od 500 °C dobiven je kruti ostatak od 20,6 % koji se pripisuje nastajanju djelomično umreženih molekula celuloze.<sup>22</sup> Dodatkom BNC-a u PLA iz krivulje TG vidljivo je da se početak toplinske razgradnje pomiče ka nižim temperaturama u odnosu na čisti PLA (s 329 na 311 °C) što ukazuje na smanjenje toplinske po-

stojanosti PLA dodatkom BNC-a. To ponašanje može se pripisati ranijem početku razgradnje BNC-a.



Slika 6 – DTG krivulje za PLA, BNC i biokompozit PLA/BNC

Fig. 6 – DTG curves for PLA, BNC, and PLA/BNC biocomposite

Općenito se toplinska razgradnja celuloze sastoji od niza složenih kemijskih reakcija na koje imaju utjecaj čimbenici kao što su temperatura, vrijeme zagrijavanja, vrsta atmosfere koja se koristi tijekom mjerenja, stupanj kristalnosti celuloze, prisutnost nečistoća i tip celuloze.<sup>22</sup> Zagrijavanjem BNC-a od sobne temperature do oko 200 °C na TG krivulji (slika 5) dolazi do smanjenja mase uzorka (4,5 %). Takva promjena mase u skladu je s literaturnim podacima<sup>23</sup> i vezana je uz isparavanje vode prisutne u BNC-u. Daljnjim zagrijavanjem BNC-a iz DTG krivulje (slika 6) vidljiva su dva stupnja toplinske razgradnje. Prvi stupanj razgradnje u temperaturnom području od 200 do 275 °C uz  $T_{max}^1$  pri 232 °C vezan je za toplinsku razgradnju proteinskih onečišćenja prisutnih u prirodnoj celulozi, dok je drugi stupanj razgradnje u području temperature od 275 do 420 °C s  $T_{max}^2$  pri 380 °C vezan za razgradnju celuloze uz nastajanje anhidroceluloze i levoglukozana (1,6-anhidro-b-D-glukopiranoza).<sup>22,24</sup>

Pojava jednog stupnja razgradnje na DTG krivulji (slika 6) za čisti PLA ukazuje na to da se toplinska razgradnja PLA odvija u jednom stupnju razgradnje u relativno kratkom temperaturnom području, početak razgradnje je na 329 °C, temperatura maksimalne brzine razgradnje ( $T_{max}$ ) pri 368 °C, dok je kraj razgradnje ( $T_k$ ) pri 376 °C (tablica 2). Ostatak pri 500 °C iznosi 0,9 %, što ukazuje na gotovo kompletnu toplinsku razgradnju PLA.<sup>14</sup>

Tablica 2 – Rezultati dobiveni TGA analizom

Table 2 – TGA results

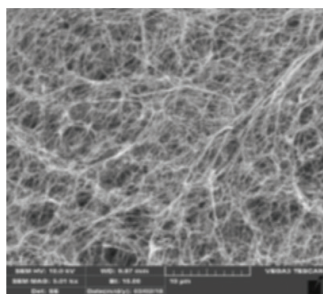
Uzorak Sample	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_{\max}^1/^\circ\text{C}$	$T_{\max}^2/^\circ\text{C}$	$T_k/^\circ\text{C}$	Ostatak na 500 °C/% Residue at 500 °C/%
BNC	211	232	380	400	20,6
PLA	329	368	–	376	0,9
PLA/BNC	311	362	–	375	2,5

Dodatkom BNC-a u PLA na DTG krivulji (slika 6) javlja se jedan stupanj toplinske razgradnje u kojem dolazi do razgradnje PLA i BNC-a. Temperatura maksimalne brzine razgradnje ( $T_{\max}$ ) i temperatura kraja razgradnje ( $T_k$ ) biokompozita ne mijenjaju se značajno u odnosu na čisti PLA (tablica 2).

### 3.4. Rezultati SEM analize

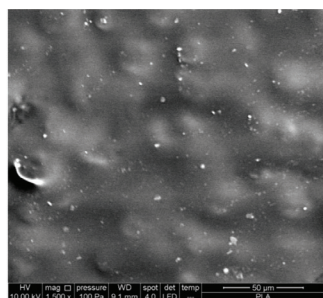
Da bi se odredila morfološka struktura biokompozita PLA/BNC, provedena je SEM analiza.

Na slici 7 prikazana je SEM mikrografija BNC-a iz koje je vidljiva vlaknasta struktura s nasumičnim rasporedom vlakana cjevastog oblika s većim i manjim promjerom vlakana.



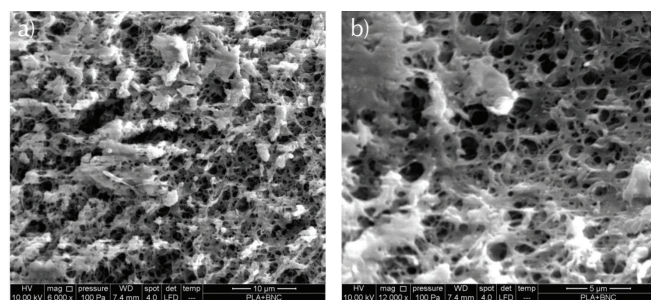
Slika 7 – SEM mikrografija BNC-a  
Fig. 7 – SEM image of BNC

SEM mikrografija površine čistog PLA prikazana je na slici 8, iz koje je vidljiva glatka morfologija.



Slika 8 – SEM mikrografija površine PLA  
Fig. 8 – SEM image of PLA surface

Kod SEM mikrografije biokompozita PLA/BNC prikazane na slici 9 kod različitog povećanja (6000 i 12000 $\times$ ) vidljivo je da dodatkom BNC-a u PLA nastaje porozna struktura biokompozita, čemu je doprinijela vlaknasta struktura BNC-a.

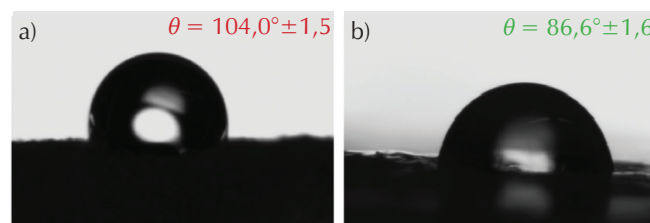


Slika 9 – SEM mikrografija biokompozita PLA/BNC uz povećanje od a) 6000 $\times$  i b) 12000 $\times$

Fig. 9 – SEM images of PLA/BNC biocomposite with magnification of a) 6000 $\times$  and b) 12000 $\times$

### 3.5. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta

Kontaktni kut određen je metodom viseće kapi (*Sessile drop*) pomoću vode. Rezultat mjerenja kontaktnog kuta s vodom za čisti PLA prikazan je na slici 10a) i ukazuje na hidrofobnu strukturu PLA ( $\theta = 104,0 \pm 1,5^\circ$ ). Sliku kapljice za BNC nije bilo moguće dobiti jer je zbog izrazite hidrofilnosti uzorak odmah upio kapljicu vode. Nakon mjerenja kontaktnog kuta s vodom za čisti PLA prevedeno je mjerenje za biokompozit PLA/BNC (slika 10b). Dobiveni rezultat kontaktnog kuta ukazuje na to da dodatkom BNC-a u PLA dolazi do smanjenja hidrofobnosti biokompozita PLA/BNC, a kontaktni kut iznosi  $86,6 \pm 1,6^\circ$ .

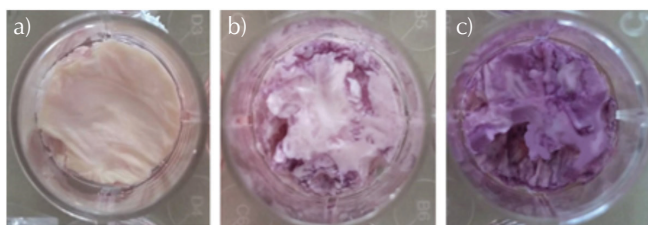


Slika 10 – Kontaktni kut s vodom za a) PLA i b) biokompozit PLA/BNC

Fig. 10 – Water drops on the surface of the a) PLA and b) PLA/BNC biocomposite

### 3.6. Rezultat zasijavanja stanica na biokompozit PLA/BNC

MTT je kolorimetrijski test citotoksičnosti kojim se procjenjuje održivost stanice u doticaju s biomaterijalom, u ovom slučaju s biokompozitom PLA/BNC. Najkraće rečeno, što je više živućih stanica, to je jače obojenje biomaterijala u ljubičasto. Na temelju provedenog MTT testa očito je da su se stanice uspješno prihvatile na biokompozitne nosače PLA/BNC nakon zasijavanja (6 h) te pokazale odgovarajuće širenje po strukturi nosača tijekom 48 h uzgoja (slika 11). Zaključno, materijal od kojeg je nosač napravljen pogodan je za prihvaćanje i rast humanih stanica, pa je prema tome potencijalno primjenjiv u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu.



Slika 11 – Diskovi/nosači nakon tretmana MTT-om a) kontrola bez stanica, b) nakon zasijavanja stanica c) 48 h nakon zasijavanja stanica

Fig. 11 – Discs/scaffolds after MMT treatment a) control without cell, b) after cell seeding, c) 48 h after cell seeding

## 4. Zaključak

FTIR-ATR analizom potvrđena je prisutnost karakterističnih funkcionalnih skupina BNC-a u pripremljenom biokompozitu PLA/BNC. Iz rezultata DSC analize vidljivo je da se staklište biokompozita PLA/BNC blago pomiče na niže vrijednosti u odnosu na čisti PLA. To ukazuje na smještanje BNC-a u amorfnu fazu PLA i povećanje pokretljivosti amorfne faze PLA. Dodatkom BNC-a u PLA temperatura hladne kristalizacije smanjuje se u odnosu na čisti PLA i dolazi do povećanja stupnja kristalnosti biokompozita u odnosu na čisti PLA, što se objašnjava djelovanjem celuloze kao nukleacijskog agensa unutar biokompozita PLA/BNC. SEM analiza potvrdila je željenu vlaknastu, poroznu morfologiju biokompozita PLA/BNC. Termogravimetrijskom analizom utvrđeno je smanjenje toplinske postojanosti biokompozita PLA/BNC u odnosu na čisti PLA uslijed ranije toplinske razgradnje BNC-a. Mjerenjem kontaktnog kuta dobivena je hidrofilna struktura biokompozita PLA/BNC u odnosu na čisti hidrofobni PLA, što je dokaz dobre interakcije između BNC-a i PLA. Na temelju provedenog MTT testa može se zaključiti da je biokompozit PLA/BNC kao nosač pogodan za prihvaćanje i rast humanih stanica. Prema tome, na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da se biokompozit PLA/BNC smatra potencijalno primjenjivim u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu.

## Literatura

### References

1. N. A Peppas, R. Langer, New challenges in biomaterials, *Science* **263** (1994) 1715–1720, doi: <https://doi.org/10.1126/science.8134835>.
2. R. Langer, D. A. Tirrell, Designing materials for biology and medicine, *Nature* **428** (2004) 487–492, doi: <https://doi.org/10.1038/nature02388>.
3. W. L. Murphy, D. J. Mooney, Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices, *J. Periodont. Res.* **34** (1999) 413–419, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1999.tb02275.x>.
4. L. Moroni, J. H. Elisseeff, Biomaterials engineered for integration, *Mater. Today* **11** (2008) 44–51, doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70089-0](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70089-0).
5. K. Hamad, M. Kaseem, H.W. Yang, F. Deri, Y. G. Ko, Properties and medical applications of polylactic acid: A review, *Express Polym. Lett.* **9** (2015) 435–455, doi: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2015.42>.
6. M. S. Lopes A. L. Jardini, R. Maciel Filho, Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications, *Proced. Eng.* **42** (2012) 1402–1413, doi: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.534>.
7. F. Esa, S. M. Tasirin, N. Abd Rahman, Overview of Bacterial Cellulose Production and Application, *Agri. Agricul. Sci. Proc.* **2** (2014) 113–119, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>.
8. N. Lin, A. Dufresne, Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect, *Eur. Polym. J.* **59** (2014) 302–325, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>.
9. L. Fu, J. Zhang, G. Yang, Present status and applications of bacterial cellulose –based materials for skin tissue repair, *Carbohydr. Polym.* **92** (2013) 1432–1442, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071>.
10. M. Ul-Islam, S. Khan, W. A. Khattak, M. Wajid, J. K. Park, u V. K. Thakur i M. K. Thakur (ur.), *Synthesis, Chemistry, and Medical Application of Bacterial Cellulose Nanocomposites, Eco-friendly Polymer Nanocomposites*. Springer, New Delhi, 2015, str. 399–437.
11. N. Schurer, A. Kohne, V. Schliep, K. Barlag, G. Goerz, Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2** (1993) 179–185, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.1993.tb00030.x>.
12. L. Micallef, F. Belaubre, A. Pinon, C. J. Vignoles, C. Delage, M. Charveron, A. Simon, Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **18** (2009) 143–151, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x>.
13. A. F. Deyrieux, V. G. Wilson, In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line, *Cytotechnol.* **54** (2007) 77–83, doi: <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9076-1>.
14. R. Z. Khoo, H. Ismail, W. S. Chow, Thermal and morphological properties of poly(lactic acid) nanocellulose nanocomposites, *Proced. Chem.* **19** (2016) 788–794, doi: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.086>.
15. L. C Radiman, A Rifathin, Preparation of phosphorylated N-ta-de-Coco for polymer electrolyte membrane applications, *J. Appl. Polym. Sci.* **130** (2013) 399–405, doi: <https://doi.org/10.1002/polb.23405>.

- org/10.1002/APP39180.
16. H. Kaczmarek, I. Vuković-Kwiatkowska, Preparation and characterization of interpenetrating networks based on polyacrylates and poly(lactic acid), *EXPRESS Polym. Lett.* **6** (2012) 78–94, doi: 10.3144/expresspolymlett.2012.9.
  17. C. M. B. Goncalves, J. A. P. Coutinho, I. M. Marrucho, Optical properties, u R. A. Auras, L.-T. Lim, S. E. M. Selke and H. Tsuji (ur.), *Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 2010, str. 97–112.
  18. A. N. Frone, D. Batalu, I. Chiulan, M. Oprea, A. R. Gabor, C.-A. Nicolae, V. Raditoiu, R. Trusca, D. M. Panaitescu, Morpho-Structural, Thermal and Mechanical Properties of PLA/PHB/Cellulose Biodegradable Nanocomposites Obtained by Compression Molding, Extrusion, and 3D Printing, *Nanomaterials* **10** (2020) 51, doi: <https://doi.org/10.3390/nano10010051>.
  19. B. W. Chieng, N. A. Ibrahim, W. M. Z. W. Yunus, M. Z. Hussein, Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets, *Polymers* **6** (2014) 93–104, doi: <https://doi.org/10.3390/polym6010093>.
  20. P. Qu, Y. Gao, G. Wu, L. Zhang, Nanocomposites of poly(lactic acid) reinforced with cellulose nanofibrils, *BioRes.* **5** (2010) 1811–1823.
  21. M. Boruvka, L. Behalek, P. Lenfeld, C. Ngaowthong, M. Pechociakova, Structure-related properties of bionanocomposites based on poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and organic impact modifier, *Mater. Technol.* **34** (2019) 143–156, doi: <https://doi.org/10.1080/10667857.2018.1540332>.
  22. A. Santmarti, K. Y. Lee, Crystallinity and thermal stability of nanocellulose, u K. Y. Lee (ur.), *Nanocellulose and sustainability: production, properties, applications and case studies*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 2018, str. 67–82.
  23. N. Pa'e, M. H. Salehudin, N. D. Hassan, A. M. Marsin, I. I. Muhammad, Thermal Behavior of Bacterial Cellulose Based Hydrogels with Other Composites and Related Instrumental Analysis u Md. Ibrahim and H. Mondal (ur.), *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*. Springer, Cham, 2019., str. 763–787.
  24. D. K. Shen, S. Gu, The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products, *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 6496–6504, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.095>.

## SUMMARY

### Preparation and Characterization of Biocomposite Based on Polylactide (PLA) and Bacterial Nanocellulose (BNC)

Nikolina Mrkonjić,<sup>a\*</sup> Gordana Martinko,<sup>a</sup> Emi Govorčin Bajsić,<sup>a</sup>  
Igor Slivac,<sup>b</sup> Vedrana Špada,<sup>c</sup> and Tamara Holjevac Grgurić<sup>d</sup>

Poly(lactic acid) (PLA) and bacterial nanocellulose (BNC) are promising materials in medicine due to their biodegradability, biocompatibility, and non-toxicity. The aim of this work was to prepare and characterize the PLA/BNC biocomposite. Morphology, chemical composition, thermal properties, thermal stability, hydrophobicity and cell seeding, and growth of the PLA/BNC biocomposite were characterized by means of scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectra (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), contact angle, and MTT method. DSC showed that the glass transition temperature ( $T_g$ ) of PLA decreased with the addition of BNC due to higher mobility of amorphous PLA phase. The degree of crystallinity increased due to nucleation effect of cellulose. With the addition of BNC, the thermal stability of biocomposite decreased. The PLA/BNC biocomposite exhibited a porous, fibrous structure. The cell seeding test showed the PLA/BNC biocomposite to be suitable for growth of human cells, and therefore, potentially applicable in regenerative medicine and tissue engineering.

#### Keywords

*Poly(lactic acid), bacterial nanocellulose, biocomposites, biomedicine, tissue engineering*

<sup>a</sup> University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Croatia

<sup>b</sup> University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Croatia

<sup>c</sup> Materials' Research Centre of the Istra County – METRIS, Croatia

<sup>d</sup> University of Zagreb, Faculty of Metallurgy, Sisak, Croatia

Original scientific paper

Received December 30, 2019

Accepted May 3, 2020